

**Auswirkungen von Hitzestress auf das Proteom und die
Proteinbiogenese in Mitochondrien:
Proteinaggregation von Elongationsfaktoren als
möglicher Schutzmechanismus gegen Proteotoxizität**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Anne Wilkening

aus

Braunschweig

Bonn, Februar 2018

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Voos
2. Gutachter: Prof. Dr. Walter Witke

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Mai 2018

Erscheinungsjahr: 2018

Publikationen

Original-Artikel

Wilkening A., Rüb C., Sylvester M. & Voos W. (2018). High aggregation sensitivity of mammalian mitochondrial elongation factor Tu (Tufm) as a sensor for organellar stress. *bioRxiv* doi: 10.1101/253153 (eingereicht)

Bruderek M., Jaworek W., Wilkening A., Rüb C., Cenini G., Fortsch A., Sylvester M. & Voos W. (2018). IMiQ: a novel protein quality control compartment protecting mitochondrial functional integrity. *Mol. Biol. Cell* **29**: 256-269

Review-Artikel

Rüb C., Wilkening A. & Voos W. (2017). Mitochondrial quality control by the Pink1/Parkin system. *Cell Tissue Res.* **367**: 111-123

Voos W., Jaworek W., Wilkening A. & Bruderek M. (2016). Protein quality control at the mitochondrion. *Essays Biochem.* **60**: 213-225

Poster

Wilkening A. & Voos W. (2017). Stress-induced aggregation in mammalian mitochondria: Inactivation of translation. Bonner Forum Biomedizin (BFB) Jahrestreffen, Hennef

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung/ Abstract.....	1
1.1 Zusammenfassung	1
1.2 Abstract.....	2
2 Einleitung.....	3
2.1 Mitochondrien	3
2.1.1 Mitochondriale Proteinbiosynthese.....	4
2.1.2 Import von Proteinen.....	5
2.1.3 Proteinfaltung und -assemblierung.....	7
2.2 Mitochondrialer Stress.....	8
2.2.1 Oxidativer Stress.....	9
2.2.2 Hitzestress	10
2.3 Mechanismen der Qualitätskontrolle	11
2.3.1 Mitochondriale Proteinqualitätskontrolle.....	12
2.3.2 Mitochondrien-spezifische Stressantwort	14
2.3.3 Mitochondriale Dynamik	15
2.3.4 Mitophagie	16
2.4 Proteinaggregation.....	17
2.4.1 Schutzmechanismen gegen Aggregation.....	18
2.4.2 Stress-Granules.....	20
3 Ziel der Arbeit	21
4 Materialien und Methoden	22
4.1 Materialien	22
4.1.1 Laborgeräte.....	22
4.1.2 Chemikalien.....	22
4.1.3 Reagenzien.....	23
4.1.4 Zellkultur Medien und Reagenzien.....	24
4.1.5 Mammalia Zelllinie.....	24
4.1.6 Primärantikörper	24
4.1.7 Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper.....	25
4.1.8 Fluoreszenz-gekoppelte Sekundärantikörper.....	25
4.1.9 Plasmide.....	25

4.2 Methoden	26
4.2.1 SDS-PAGE	26
4.2.2 Blue native PAGE	26
4.2.3 Western Blot	27
4.2.4 TCA Fällung von Proteinen	28
4.2.5 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Test	28
4.2.6 <i>In vitro</i> Transkription und Translation	28
4.2.7 Zellkulturbedingungen	28
4.2.8 Hitzeschock	29
4.2.9 Oxidativer Stress	29
4.2.10 Immunzytochemie	29
4.2.11 Durchflusszytometrie	30
4.2.12 Isolation von Mitochondrien	30
4.2.13 Isolation aggregierter mitochondrialer Proteine nach Stress	31
4.2.14 Sedimentation von Aggregaten	32
4.2.15 Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation	32
4.2.16 Einfluss hoher Salzkonzentrationen auf die Proteinaggregation	32
4.2.17 Wiederherstellung der Löslichkeit aggregierter Proteine nach Hitzestress	33
4.2.18 Proteinase K Behandlung von Mitochondrien	33
4.2.19 Messung des mitochondrialen Membranpotenzials isolierter Mitochondrien	33
4.2.20 Bestimmung des ATP-Gehalts isolierter Mitochondrien	34
4.2.21 Bestimmung von Enzymaktivitäten in isolierten Mitochondrien	34
4.2.22 Zweidimensionale Differenz-Gelelektrophorese (2D-DIGE)	34
4.2.23 Peptidvorbereitung und MALDI-TOF	36
4.2.24 <i>In organello</i> Translation	37
4.2.25 <i>In vitro</i> Import von [³⁵ S]-markierten Prä-Proteinen in isolierte Mitochondrien	38
5 Ergebnisse	39
5.1 Generelle Effekte von Hitzestress	39
5.1.1 Einfluss von Hitzestress auf die Morphologie von Mitochondrien in intakten HeLa Zellen	39
5.1.2 Einfluss von Hitzestress auf das Membranpotenzial und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in Mitochondrien intakter HeLa Zellen	40
5.1.3 Einfluss von Hitzestress auf das Membranpotenzial isolierter Mitochondrien	42
5.1.4 ATP-Gehalt in Mitochondrien nach Hitzestress	43
5.1.5 Mitochondriale Integrität nach Hitzestress	44
5.1.6 Einfluss von Hitzestress auf die mitochondrialen Atmungskettenkomplexe	45

5.1.7 Einfluss von Hitzestress auf die enzymatische Aktivität mitochondrialer Enzyme	47
5.2 Analyse des mitochondrialen Proteoms nach Hitzeschock.....	48
5.3 Aggregationsverhalten der mitochondrialen Elongationsfaktoren	54
5.3.1 Temperaturabhängige Aggregation.....	54
5.3.2 Proteinaggregation bei oxidativem Stress.....	56
5.3.3 ATP- und GTP-Abhängigkeit der Proteinaggregation.....	58
5.3.4 Zeitabhängigkeit der Aggregation bei Hitzestress.....	60
5.3.5 Sedimentationseigenschaften der Aggregate nach Hitzestress.....	61
5.3.6 Untersuchung der Assoziation von Tufm und dem Ribosom unter Hitzestress.....	65
5.3.7 Proteinase K-Resistenz der Tufm Aggregate nach Hitzeschock.....	66
5.3.8 Regeneration aggregierter Proteine nach Hitzeschock	67
5.3.9 Degradation mitochondrialer Proteine bei Hitzestress.....	67
5.4 Auswirkungen von Hitzestress auf die mitochondriale Funktion.....	68
5.4.1 Mitochondriale Translationskontrolle bei Hitzestress.....	68
5.4.2 Regeneration der Translation nach Hitzestress	70
5.4.3 Mitochondriale Importeffizienz bei Hitzestress	71
5.4.4 Aggregation frisch importierter Proteine nach Hitzeschock	72
6 Diskussion	75
6.1 Effekte von Stress auf die Morphologie und Funktion humaner Mitochondrien.....	75
6.2 Hitzestabilität mitochondrialer Proteine	77
6.3 Funktionen der mitochondrialen Elongationsfaktoren.....	79
6.3.1 Effekte von Tufm- und Tsfm-Mutationen auf die Mitochondrienfunktion.....	81
6.4 Nukleotid-unabhängige Aggregation unter verschiedenen Stressbedingungen	81
6.5 Inhibition der mitochondrialen Translation nach Hitzestress.....	84
6.6 Modell des mitochondrialen Schutzmechanismus vor Proteotoxizität.....	89
6.7 Offene Fragen und Ausblick	91
7 Abkürzungsverzeichnis	92
8 Abbildungsverzeichnis.....	96
9 Literaturverzeichnis	98
Danksagung.....	109

1 Zusammenfassung/ Abstract

1.1 Zusammenfassung

Für das Überleben eines Organismus stellen Temperaturen, die über der physiologischen Wachstumsbedingung liegen, eine Herausforderung dar. Da Proteine optimiert sind, bei einer bestimmten Temperatur stabil zu sein, können bereits kleine Änderungen zu Proteinentfaltung und unspezifischer Aggregation führen. Mögliche Folgen sind sowohl der Funktionsverlust von Proteinen als auch zytotoxischer Stress aufgrund von Aggregatbildung, der sogenannten Proteotoxizität.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von physiologischem Hitzestress auf das mitochondriale Proteom in humanen Zellen untersucht. Hierfür wurden intakte, isolierte Säugetiermitochondrien dem Einfluss von Hitzestress ausgesetzt und jene Proteine, welche eine starke Tendenz zur Aggregation aufwiesen, mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese und Massenspektrometrie identifiziert. Die Ergebnisse zeigten eine bemerkenswerte Stabilität des mitochondrialen Proteoms gegenüber erhöhten Temperaturen. Als Ausnahme wies der mitochondriale Elongationsfaktor Tu, welcher essenziell für die mitochondriale Translation ist, eine starke Thermolabilität auf. Zudem konnte gezeigt werden, dass in hitzestresserten Mitochondrien sowohl die Translation als auch der Import zytosolischer Proteine defekt ist. Eine Inhibition beider Prozesse könnte eine potenzielle Schutzfunktion der Mitochondrien darstellen, um zusätzlichen proteotoxischen Stress durch die Fehlfaltung und mögliche Aggregation frisch synthetisierter oder importierter Proteine unter Hitzestresseinfluss zu verhindern. Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen die Annahme, dass der mitochondriale Elongationsfaktor Tu als Sensor für mitochondrialen Stress von entscheidender Bedeutung für die Proteinhomöostase der Mitochondrien ist.

1.2 Abstract

Temperatures above the respective physiological growth temperature represent a challenging problem for the survival of organisms. As proteins are optimized to be stable at natural temperatures, small variations may cause protein unfolding and unspecific aggregation leading to a loss of function as well as cytotoxic stress due to aggregate formation, so called proteotoxicity.

In this study the impact of heat stress on the mitochondrial proteome in human cells was investigated. Intact isolated mitochondria from mammalian cells were incubated under physiological heat stress conditions and aggregation-prone proteins were identified by two dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. The results of this work revealed a remarkable stability of the proteome to elevated temperatures. However, one protein, which is essential for the mitochondrial translation, the mitochondrial translation elongation factor Tu, showed a very thermolabile behavior. Further this study was able to demonstrate that translation in heat stressed mitochondria as well as the import of cytosolic proteins was defective. An inhibition of both effects could have a potential protective function for the mitochondria as additional proteotoxic stress by misfolding and potential aggregation of freshly imported or translated proteins is prevented during stress conditions. The results of this thesis support the assumption that the mitochondrial translation factor Tu as a sensor for mitochondrial stress could be a very important factor for the mitochondrial protein homeostasis.

2 Einleitung

Zellen stehen unter der ständigen Herausforderung die Integrität und Funktionalität des Proteoms aufrecht zu erhalten. Dieser Prozess der Proteinhomöostase (Proteostase) stellt ein dynamisches Gleichgewicht der Synthese, der Faltung sowie der Degradation von Proteinen her (Hartl, 2017). Zur Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase besitzen Zellen ein Proteinqualitätskontrollsystem, welches aus molekularen Chaperonen und Proteasen besteht (Bukau et al., 2006; Hartl et al., 2011). Innerhalb einer Zelle können Proteine einer Vielzahl von Stressbedingungen ausgesetzt sein, welche zu einem Ungleichgewicht der Proteostase und somit zu dem Funktionsverlust von Proteinen sowie der Ansammlung geschädigter Polypeptide führen kann.

Mitochondrien spielen als multifunktionale Organellen eine entscheidende Rolle für die gesamte Zelle (Topf et al., 2016). Als endosymbiontische Organellen besitzen sie ein eigenes Netzwerk aus Chaperonen und Proteasen, welche die Homöostase des mitochondrialen Proteoms gewährleisten. Ist die Kapazität der mitochondrialen Proteostase-Maschinerie aufgrund von externem oder internem Stress, überlastet, so können Proteinaggregationen eine Dysfunktion der Mitochondrien induzieren. Eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktionalität kann weitreichende zelluläre Konsequenzen haben und steht mit einer Vielzahl neurodegenerativer Krankheiten des Menschen in Verbindung (Tatsuta, 2009).

2.1 Mitochondrien

Als lebenswichtige Organellen sind Mitochondrien in eine Vielzahl metabolischer Prozesse involviert. Als „Kraftwerke der Zelle“ tragen Mitochondrien erheblich zur Energieversorgung der Zelle bei, indem sie ATP über den Prozess der oxidativen Phosphorylierung produzieren. Des Weiteren sind Mitochondrien Ort des Zitratzyklus, der β -Oxidation von Fettsäuren, des Aminosäurestoffwechsels sowie der Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern.

Mitochondrien sind ubiquitär in eukaryotischen Zellen vertreten. Ihr Ursprung geht auf die Symbiose von α -Proteobakterien mit eukaryotischen Vorläuferzellen zurück. Als Endosymbionten entwickelten sich Mitochondrien über Millionen von Jahren, wobei Eigenschaften der bakteriellen Vorläufer, wie zum Beispiel das Vorhandensein einer Doppelmembran, welche die Grundlage für die ATP-Produktion darstellt, erhalten blieben. Obgleich als Konsequenz der endosymbiontischen Lebensweise ein Großteil der

genetischen Information entweder verloren oder an den Nukleus transferiert wurden, besitzen Mitochondrien noch immer ihr eigenes Genom sowie ein eigenständiges Genexpressionssystem. Menschliche Mitochondrien besitzen multiple Kopien der ca. 16-kb zirkulären mitochondrialen DNA, welche 2 rRNAs, 22 tRNAs und 13 mRNAs kodiert (Anderson et al., 1981). Das menschliche mitochondriale Genom beinhaltet die genetische Information von 13 Proteinen, welche ausschließlich Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe bilden. Die Synthese dieser Proteine innerhalb der Mitochondrien stellt einen entscheidenden Vorteil dar, da es sich um hydrophobe Proteine handelt, die nicht leicht vom Zytosol in die Mitochondrien importiert werden können. Der Großteil der mitochondrialen Proteine mit 1500 prognostizierten Polypeptiden (Taylor et al., 2003), wird im Nukleus kodiert, an zytosolischen Ribosomen synthetisiert und post-translational in die Mitochondrien transportiert (Chacinska et al., 2009; Neupert, 2015). Da die Atmungskettenkomplexe, mit Ausnahme von Komplex II, sowohl aus nukleär als auch aus mitochondrial kodierten Untereinheiten bestehen, stellt deren Assemblierung zu funktionellen Komplexen in den Mitochondrien einen streng koordinierten Prozess dar. Dieser wird über sogenannte Assemblierungsfaktoren reguliert, welche Zwischenstufen der Komplexe stabilisieren und dadurch die Reifung der Enzyme vermitteln (Dennerlein & Rehling, 2015).

2.1.1 Mitochondriale Proteinbiosynthese

Mitochondrien besitzen ihre eigene Maschinerie für die DNA-Replikation, Transkription und Translation. Der Großteil der benötigten Komponenten, wie zum Beispiel die Proteinuntereinheiten der mitochondrialen Ribosomen (Mitoribosomen), werden jedoch im Nukleus kodiert und machen etwa ein Drittel des gesamten mitochondrialen Proteoms aus (Mick et al., 2011). Eine Besonderheit des mitochondrialen Genoms stellt der veränderte genetische Code dar, welcher sich von dem universalen Code unterscheidet. So werden zum Beispiel in humanen Mitochondrien die Arginin Codons AGG sowie AGA, zusätzlich zu UAA und UAG, für die Termination und UGA als Codon für Tryptophan und nicht als Stopp-Codon verwendet (Ott et al., 2016). Als weiteren Unterschied weisen die Ribosomen der Mitochondrien aufgrund ihrer Evolution aus bakteriellen Vorläufern eine veränderte Struktur im Vergleich zu zytosolischen Ribosomen auf. Das Mitoribosom in Säugetieren besteht aus einer 28S kleinen Untereinheit und einer 39S großen Untereinheit, welche den 55S Komplex bilden (Richter-Dennerlein, 2015).

Die mitochondriale Translation besteht aus den drei universellen Schritten Initiation, Elongation und Termination, wobei jeder Schritt durch Mitochondrien-spezifische Translationsfaktoren vermittelt wird. Im ersten Schritt der Translation wird das Startcodon durch Initiationsfaktoren erkannt und das Ribosom assembliert an der mRNA. Während der Elongation bildet der mitochondriale Elongationsfaktor Tu (Tufm) mit GTP und einer mit Aminosäure beladenen Aminoacyl-tRNA einen ternären Komplex und vermittelt den Transport zu der A-Stelle des Ribosoms. Die Aminosäure wird Codon-spezifisch an die wachsende Polypeptidkette angefügt, GTP zu GDP hydrolysiert und der Komplex aus GDP und Tufm vom Ribosom freigesetzt. Der Austausch von GDP zu GTP erfolgt durch die Interaktion mit dem mitochondrialen Elongationsfaktor Ts (Cai et al., 2000), sodass Tufm erneut einen ternären Komplex mit beladener Aminoacyl-tRNA bilden kann. Die Translation wird beendet, sobald ein Stopp-Codon die A-Stelle des Ribosoms erreicht. Das Stopp-Codon wird durch Release-Faktoren erkannt, die das Freisetzen der Polypeptidkette sowie die Disassemblierung des Mitochondrios in seine Untereinheiten, vermittelt.

Mitochondrial kodierte Proteine werden ko-translational in die innere Mitochondrienmembran eingebaut, wodurch die Möglichkeit der Aggregation dieser hydrophoben Polypeptide vermindert wird. Dies wird durch den Polypeptid-Exit-Tunnel der Mitochondrien ermöglicht, welcher durch hydrophobe Reste der mitochondrialen Membran ähnelt und das Falten der Polypeptide begünstigt. Die ko-translationale Insertion wird durch das Protein Oxidase Assembly 1 (Oxa1), einen Liganden des Exit-Tunnels, vermittelt (Ott et al., 2016).

2.1.2 Import von Proteinen

Der Großteil der mitochondrialen Proteine liegt im Zellkern kodiert vor. Da deren Synthese an zytosolischen Ribosomen erfolgt, müssen neu translatierte Proteine in die Mitochondrien importiert werden. Da der Mechanismus des Proteinimports am besten in *Saccharomyces cerevisiae* untersucht wurde, werden im Folgenden die generellen Prozesse des Proteinimports anhand der Importmaschinerien in Hefe beschrieben. Obgleich in höheren Eukaryoten ebenfalls neue Mechanismen und Komponenten des Importprozesses bewiesen wurden, liegt eine hohe Konservierung der Hauptkomponenten des mitochondrialen Imports von Hefe zum Menschen vor (Kang et al., 2017).

Proteine, die für den Import in Mitochondrien bestimmt sind, besitzen zum Großteil eine N-terminale Zielsequenz (engl.: mitochondria targeting signal (MTS)), die zwischen 10-80

Aminosäurereste lang ist und positiv geladene amphipathische α -Helices bildet (Neupert & Herrmann, 2007). Proteine, welche im Zytosol vorkommen und noch die MTS-Präsequenz enthalten, liegen als Prä-Form vor. Da es sich bei den meisten mitochondrialen Proteinen um Matrixproteine handelt, müssen diese durch die äußere und innere Mitochondrienmembran transferiert werden. Die Präproteine aus dem Zytosol werden zunächst durch den TOM-Komplex (engl.: translocase of the outer membrane) und anschließend durch den TIM23-Komplex (engl.: translocase of the inner membrane) in die Mitochondrien transportiert. Hierbei wird die MTS der Präproteine durch die Rezeptoren Tom20, Tom22 und Tom70 im Zytosol erkannt und durch den TOM-Kanal durch die Außenmembran zum TIM23-Komplex transferiert. Das durch die Atmungskette aufgebaute Membranpotenzial aktiviert den TIM23-Kanal und vermittelt die Translokation des Präproteins durch die Innenmembran. Der Proteinimportkomplex in die Matrix wird durch das mitochondriale Chaperon Hsp70 unter ATP-Verbrauch vervollständigt (Becker et al., 2012). Tim44 bindet Hsp70 an den Importkanal und ist zudem mit den Ko-Chaperonen Pam18 und Pam16, welche die ATPase Aktivität von Hsp70 stimulieren, sowie dem Nukleotidaustauschfaktor Mge1, der die Freisetzung von ADP und somit die erneute ATP-Bindung und Präprotein Translokation stimuliert, assoziiert. Dieser Motorkomplex bestehend aus Hsp70, Tim44, Pam16, Pam18 sowie Mge1 liegt assoziiert mit dem TIM23-Kanal vor und wird als PAM (engl.: ATP-driven presequence translocase-associated motor) bezeichnet (Chacinska et al., 2009; D'Silva et al., 2004).

Aufgrund der Beschaffenheit der Transportkanäle können die Proteine lediglich in ihrer ungefalteten Konformation durch die mitochondrialen Membranen transportiert werden. Die mitochondriale Importmaschinerie ist durch die ATP-betriebene Aktivität von Hsp70 in der Matrix in der Lage, die Proteine simultan zur Importreaktion zu entfalten (Voos & Röttgers, 2002). Nach erfolgreichem Import wird die Präsequenz durch die Protease MPP (engl.: mitochondrial processing peptidase) abgespalten und das reife Protein in die Matrix entlassen.

Die hydrophoben Membranproteine der Mitochondrien besitzen im Gegensatz zu den Matrix Proteinen interne Zielsignale, welche nach erfolgtem Import durch den TOM-Komplex in den Intermembranraum nicht abgespalten und entweder durch den Außenmembrankomplex SAM (engl.: sorting and assembly machinery) oder den Innenmembrankomplex TIM22 erkannt werden. Proteine des Intermembranraums hingegen besitzen ein internes Signal bestehend aus Cysteinresten und werden im

Intermembranraum durch den Assemblierungskomplex MIA (engl.: mitochondrial intermembrane space assembly) oxidiert und gefaltet (Chacinska et al., 2009; Kulawiak et al., 2013; Schmidt et al., 2010) (Abb. 1).

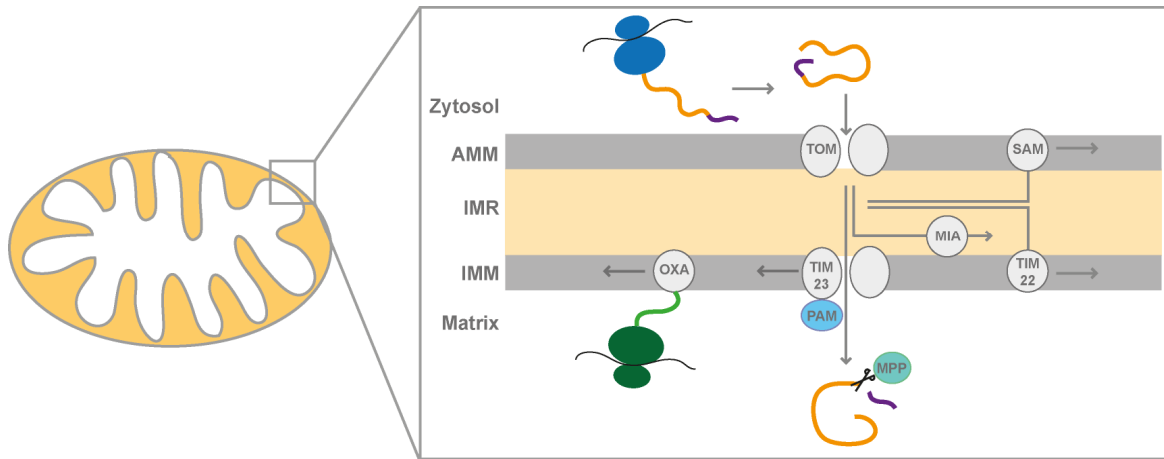


Abbildung 1: Die mitochondriale Proteinbiogenese. Der Großteil mitochondrialer Proteine wird an zytosolischen Ribosomen synthetisiert und durch den TOM-Komplex (engl.: translocase of the outer membrane) durch die äußere Mitochondrienmembran (AMM) transportiert. Nachdem das Präprotein durch den TOM-Kanal in den Innenmembranraum (IMR) transportiert wurde, kann es verschiedene Wege einschlagen. Proteine, welche Zielsignale für die Matrix besitzen, werden durch den TIM23-Komplex (engl.: translocase of the inner membrane) und den Importmotor PAM (engl.: ATP-driven presequence translocase-associated motor) über die innere Mitochondrienmembran (IMM) importiert. Die Präsequenz wird anschließend durch die Peptidase MPP (engl.: mitochondrial processing peptidase) entfernt. Die internen Signalsequenzen der Membranproteine werden entweder über den Außenmembrankomplex SAM (engl.: sorting and assembly machinery) oder über den Innenmembrankomplex TIM22 erkannt. Proteine des Intermembranraums werden über den Assemblierungskomplex MIA (engl.: mitochondrial intermembrane space assembly) importiert und gefaltet. Die mitochondrial kodierten Proteine werden an Mitoribosomen synthetisiert und ko-translational über den OXA-Komplex (engl.: Oxidase Assembly 1) in die innere Membran exportiert.

2.1.3 Proteinfaltung und -assemblierung

Die frisch importierten Polypeptide liegen nach ihrer Translokation in der mitochondrialen Matrix in ihrer ungefalteten Konformation vor, welche sie anfälliger für Schäden durch externen Stress macht. Da dies zu Fehlfaltungen und Aggregation führen kann, stabilisiert das mitochondriale Proteinqualitätskontrollsystem die frisch importierten, ungefalteten Polypeptide und vermittelt deren korrekte Faltung (Voos, 2013). Die Rückfaltung in ihre native Form sowie die weitere Assemblierung zu Proteinkomplexen wird in der mitochondrialen Matrix durch die Chaperone Hsp60 und Hsp70 initiiert.

Aufgrund ihres unterschiedlichen genetischen Ursprungs werden die Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe an verschiedenen Orten, im Zytosol oder in den Mitochondrien, translatiert und müssen somit in der mitochondrialen Innenmembran zu einem funktionellen Enzymkomplex assembliert werden. Dieser Prozess wird durch Assemblierungsfaktoren vermittelt, welche Zwischenstufen des Komplexes bei der Assemblierung stabilisieren und die Reifung der Enzyme vermitteln. Mutationen in diesen Faktoren ziehen schwerwiegende mitochondriale Dysfunktionen nach sich und konnten zum Beispiel bei Leigh Syndrom Patienten nachgewiesen werden (Dennerlein & Rehling, 2015).

In menschlichen Mitochondrien besteht der größte Atmungskettenkomplex, die NADH-Dehydrogenase (Komplex I), aus 44 Untereinheiten, von welchen 7 mitochondrial kodiert werden. Der kleinste Komplex, die Succinat-Dehydrogenase (Komplex II), besteht aus 4 Untereinheiten, welche ausschließlich im Nukleus kodiert werden. Komplex III (Cytochrom-bc₁-Komplex) besteht aus 10 nukleär kodierten Untereinheiten und einem Protein, welches im Mitochondrium synthetisiert wird. Drei der 14 Untereinheiten der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) werden in den Mitochondrien synthetisiert, wohingegen der Rest im Nukleus kodiert wird (Dennerlein & Rehling, 2015). Da die Funktionalität der Atmungskettenkomplexe essentiell für den gesamten Metabolismus der Zelle ist, stellt eine Koordination des zytosolischen und des mitochondrialen Translationssystems einen wichtigen Faktor dar, um die Ansammlung von nicht assemblierten Untereinheiten zu verhindern. In Hefe gründet sich die Regulation der Translation mitochondrialer mRNA auf spezifische Translationsaktivatoren, welche 5'-UTRs (engl.: untranslated regions) auf der mRNA erkennen. Da in Säugetiermitochondrien jene 5'-UTRs nicht vorhanden sind, erfolgt die Koordination über Assemblierungskomplexe, welche Assemblierungsfaktoren beinhalten (Richter-Dennerlein et al., 2015). Im Fall einer nicht korrekten Assemblierung der Atmungskettenkomplexe können diese die Synthese der mitochondrial kodierten Untereinheiten verringern. Dieser Rückkopplungsprozess (engl.: feedback loop) ist bereits für die Assemblierung des Cytochrom-bc₁-Komplexes sowie für die Cytochrom-c-Oxidase genauer beschrieben (Ott et al., 2016).

2.2 Mitochondrialer Stress

Es gibt verschiedene Einflüsse, welche in Mitochondrien Schäden auslösen können. Diese können umweltbedingt (toxische Chemikalien, erhöhte Temperaturen), genetischen

Ursprungs (Mutationen in Genen, die für metabolische Prozesse oder Reparaturmechanismen vonnöten sind) oder spontaner Natur (Bildung reaktiver Sauerstoffspezies) sein. Die Folgen können Schäden in Proteinen, DNA oder Lipiden sein. Dies kann einen Verlust metabolischer Funktionen der Mitochondrien wie der ATP-Synthese sowie den Verbrauch von ATP zur Aufrechterhaltung des Membranpotenzials zur Folge haben. Zudem können geschädigte Mitochondrien zur Bildung weiterer reaktiver Sauerstoffspezies beitragen (Youle & van der Bliek, 2012).

Mitochondrialer Stress stellt aufgrund von Einflüssen auf den Alterungsprozess, durch die Akkumulation von DNA-Mutationen sowie der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, einen erheblichen Risikofaktor für neurodegenerative Krankheiten wie Amyotrophe Lateralsklerose, Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson oder Chorea Huntington dar (Lin & Beal, 2006).

2.2.1 Oxidativer Stress

Als Nebenprodukte der ATP-Produktion in Mitochondrien entstehen bei dem Elektronentransport durch die Atmungskettenkomplexe reaktive Sauerstoffspezies (engl.: reactive oxygen species (ROS)). Die Produktion des Sauerstoffradikals Hyperoxid-Anion ($O_2^{\bullet-}$) erfolgt vor allem durch die Komplexe I und II der Atmungskette. Die $O_2^{\bullet-}$ Produktion kann sowohl in der mitochondrialen Matrix als auch im Intermembranraum sowie der Außenmembran erfolgen und mittels einer Superoxiddismutase katalysierten Reaktion zu der Bildung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) führen (Murphy, 2009). Eine erhöhte ROS-Bildung kann oxidativen Stress und somit verschiedene Schäden in Mitochondrien auslösen: (1) DNA-Modifikationen, welche Ursachen für Krebs, vorzeitiges Altern oder neurodegenerative Krankheiten sein können. (2) Oxidation und Inaktivierung von Eisen-Schwefel-Proteinen, welche durch Proteasen abgebaut und durch Neusynthese ersetzt werden müssen. (3) Lipidperoxidation, welche die Integrität der mitochondrialen Membran und somit wichtige Funktionen wie Atmung, oxidative Phosphorylierung, die Aufrechterhaltung des Membranpotenzials und die Regulation der intrazellulären Calcium-Homöostase beeinflussen kann (Ott et al., 2007). Die Peroxidation des Phospholipids Cardiolipin in der mitochondrialen Innenmembran löst dessen Assoziation mit Cytochrom c, welches als Folge in das Zytosol freigesetzt wird. Dies hat die Aktivierung der zellulären Apoptosemaschinerie zur Folge (Murphy, 2009) (Abb. 2).

2.2.2 Hitzestress

Temperaturen oberhalb der physiologischen Wachstumstemperatur stellen für das Überleben eines Organismus eine Herausforderung dar. Es sind verschiedenen Effekte von Hitzestress auf die Organisation eukaryotischer Zellen bekannt, wie zum Beispiel die Schädigung des Zytoskeletts, die Fragmentierung von Organellen, das Anschwellen des Nukleus, die Bildung von Stress-Granules oder das Aussetzen des Zellzyklus (Richter et al., 2010). Beim Menschen kommt die Spermatogenese zum Erliegen wenn die Körpertemperatur über 37 °C steigt. Eine Erhöhung der Körpertemperatur kann sich jedoch unter bestimmten Bedingungen auch positiv auf den Organismus auswirken. So hat sich in Vertebraten zum Beispiel die Fieberreaktion als Überlebensvorteil evolviert, da diese das Immunsystem reguliert und somit den Organismus gegen Infektionen schützt (Evans et al., 2015).

Auf Proteinebene ist Hitzestress für die Denaturierung und somit funktionelle Inaktivierung von Polypeptiden verantwortlich. Proteine sind evolutionär optimiert, bei einer bestimmten Temperatur eine stabile Struktur aufzuweisen. Bereits geringe Temperaturerhöhungen können zur Entfaltung von Proteinen sowie zu deren Aggregation führen (Richter et al., 2010) (Abb. 2).

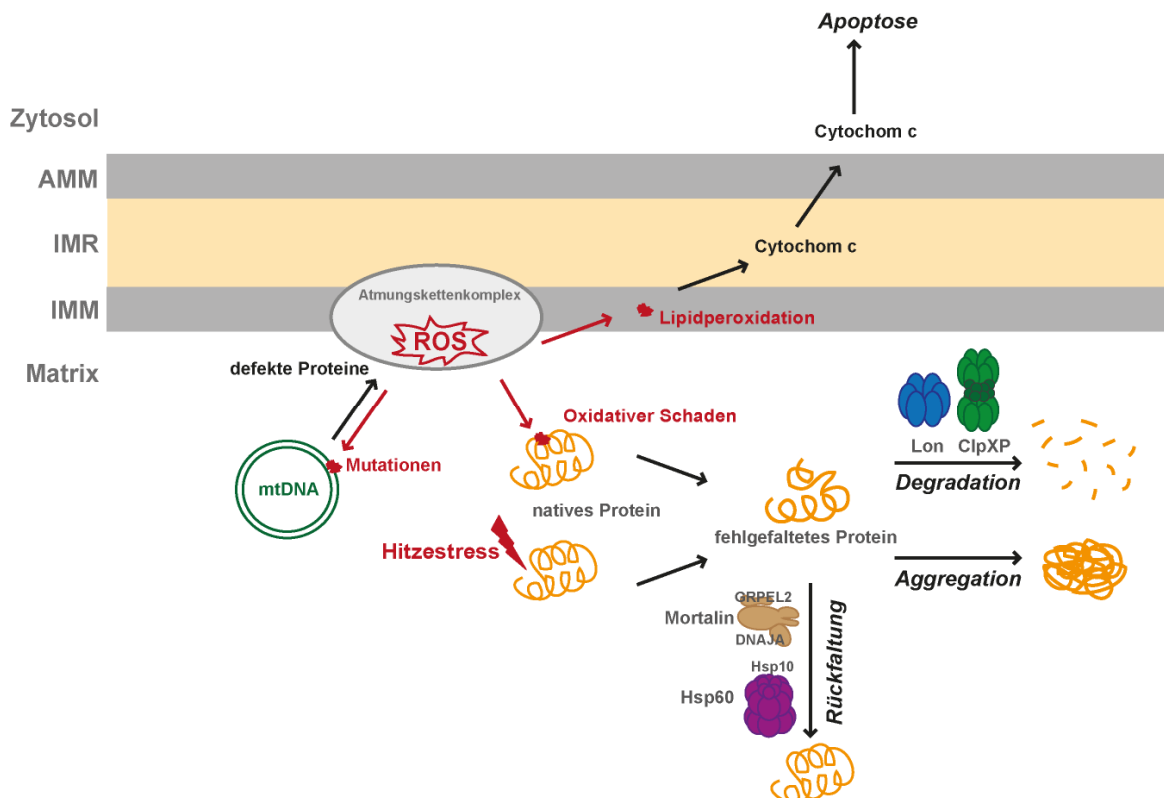


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Auswirkungen von Stress auf mitochondriale Proteine sowie das Proteinqualitätsnetzwerk in Mitochondrien. Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies als Nebenprodukt der ATP-Produktion durch die Atmungskettenkomplexe kann zu verschiedenen oxidativen Schäden in den Mitochondrien führen: Modifikationen der mitochondrialen DNA, Lipidperoxidation, welche zur Freisetzung von Cytochrom c und somit zur Auslösung der Apoptose führen kann, sowie oxidative Schäden von Proteinen, welche zu Fehlfaltungen führen. Fehlfaltete Proteine können in Säugetiermitochondrien durch die Chaperone Mortalin und Hsp60 zu ihrer nativen Struktur zurückgefaltet, durch die Proteasen Lon oder ClpXP abgebaut werden oder Aggregate bilden.

2.3 Mechanismen der Qualitätskontrolle

Mitochondriale Dysfunktion kann schwerwiegende Folgen für die Zelle und somit für den gesamten Organismus haben. Der Einfluss geschädigter Mitochondrien spielt sowohl bei altersassoziierten sowie neurodegenerativen Krankheiten beim Menschen eine Rolle. Die Funktionalität mitochondrialer Proteine wird durch ein Netzwerk aus molekularen Chaperonen und Proteasen gewährleistet, welche unter Normal- und Stressbedingungen die Integrität von Proteinen erhalten und die Akkumulation geschädigter Proteine verhindern (Tatsuta, 2009). Die mitochondriale Qualitätskontrolle ist mit besonderen Schwierigkeiten konfrontiert. Da Mitochondrien Ort der ROS-Produktion sind, sind mitochondriale Proteine der ständigen Gefahr der Schädigung durch oxidative Modifikationen ausgesetzt. Eine weitere Herausforderung besteht in der korrekten

Assemblierung der Proteinuntereinheiten der Atmungskettenkomplexe, welche sowohl zytosolischen als auch mitochondrialen Ursprungs sind. Die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts von Neusynthese, Import, Faltung und Degradation von Proteinen ist für die Funktion von Mitochondrien von entscheidender Bedeutung (Varabyova et al., 2013). Sind Mitochondrien Stress ausgesetzt, so gibt es verschiedene Ebenen der Qualitätskontrolle, um der Ansammlung geschädigter Proteine vorzubeugen. Zunächst wird mittels des internen mitochondrialen Proteinqualitätskontrollsystems versucht, beschädigte Proteine zurückzufalten oder abzubauen (Voos, 2009). Ist dieses System jedoch überlastet, so kann die nukleäre Expression von Proteinen des mitochondrialen Proteinqualitätskontrollsystems hochreguliert werden, ein Prozess der als mitochondriale ungefaltete Proteinantwort (UPR^{mt}) bezeichnet wird (Schulz & Haynes, 2015). Ist die Beschädigung jedoch zu schwerwiegend, so werden die geschädigten Mitochondrien entfernt (Mitophagie) (Ashrafi & Schwarz, 2013). Sofern der zelluläre Schaden aufgrund der Mitochondrien zu groß ist, wird die Zelle ihren programmierten Zelltod, die Apoptose, einleiten (Nunnari & Suomalainen, 2012).

2.3.1 Mitochondriale Proteinqualitätskontrolle

Mitochondrien besitzen ihre eigene Ausstattung an ATP-abhängigen Proteasen und molekularen Chaperonen, um Proteine unter Normal- als auch Stressbedingungen in einem funktionellen und aktiven Zustand zu erhalten und so die Ansammlung fehlgefalteter Polypeptide und möglicher toxischer Proteinaggregate zu verhindern. Chaperone, auch Hitzeschockproteine genannt, sind in der Lage, ungefaltete, naszierende Polypeptide, die bei der Proteinbiosynthese entstehen sowie fehlgefaltete, denaturierte Proteine als Folge von Stressbedingungen zu erkennen, diese zurückzufalten und zu stabilisieren, um deren Löslichkeit und Aktivität zu gewährleisten. Für die Proteinhomöostase in menschlichen Mitochondrien sind Chaperone der Klasse Hsp60, Hsp70, Hsp90 und Hsp100 verantwortlich (Voos, 2013).

Chaperone der Hsp70 Familie sind in allen Organismen verbreitet und in eukaryotischen Zellen im Zytosol, im Endoplasmatischen Retikulum, im Nukleus, den Chloroplasten sowie in den Mitochondrien vertreten (Mayer & Bukau, 2005). Sie besitzen eine konservierte Struktur mit N-terminaler ATPase-Domäne sowie einer C-terminalen Peptidbindedomäne. Letztere weist eine hohe Affinität für kurze unstrukturierte Proteinsegmente, die reich an hydrophoben Aminosäuren und von positiven Ladungen flankiert sind, auf (Mayer, 2013). Die Bindungsaffinität zu ungefalteten Proteinen sowie

deren Freisetzung werden durch die intrinsische ATPase-Aktivität unter Einwirkung der Ko-Chaperone GRPEL2 (GrpE protein homolog 2) und DNAJA3 (DnaJ homolog subfamily A member 3) bestimmt (Deocaris et al., 2006; Iosefson et al., 2012).

Des Weiteren interagieren Hsp60 Chaperone in der Mitochondrienmatrix, auch Chaperonine genannt, direkt mit frisch importierten Proteinen und vermitteln deren korrekte Faltung (Ostermann et al., 1989). Hsp60 bildet große Proteinkomplexe, bestehend aus zwei gestapelten Ringen, deren Hohlraum mit hydrophoben Aminosäuren ausgekleidet ist und Platz für die ungestörte Rückfaltung ungefalteter Polypeptidketten bietet. Der Kofaktor Hsp10 ist in der Lage, die Öffnung dieses Hohlraums zu verschließen. Die Hydrolyse von ATP induziert eine Konformationsänderung, so dass der Hohlraum des Komplexes hydrophiler wird und das ungefaltete Polypeptidsubstrat ohne Kontakt mit externen Proteinen in seine native, aktive Form zurückgefaltet werden kann (Voos, 2013).

ClpB Chaperone, welche zu der Hsp100 Proteinfamilie gehören, kommen in Bakterien, Pflanzen und Pilzen, jedoch nicht in Metazoa vor. Das mitochondriale ClpB Homolog in Hefe, Hsp78, ist für die Resolubilisierung aggregierter Proteine zu ungefalteten Polypeptidketten verantwortlich und trägt somit zur Wiederherstellung der mitochondrialen Funktionalität nach Stresseinwirkung bei (Moczko et al., 1995; Schmitt et al., 1996). Die Fähigkeit höherer Organismen ihre Körpertemperatur zu regulieren sowie durch aktive Bewegung extremen Stresssituationen wie Hitzestress auszuweichen, könnte deren Unabhängigkeit von der Disaggregationsaktivität der ClpB Chaperone erklären (Voos, 2013). Allerdings wurde für das zytosolische Hsp70-Hsp40 Chaperonsystem in Interaktion mit dem Ko-Chaperon Hsp110 in Säugetieren *in vitro* ebenfalls eine Dissaggregationsaktivität nachgewiesen, welche als Kompensation für das Fehlen der ClpB Chaperone in höheren Eukaryoten dienen könnte (Nillegoda & Bukau, 2015; Rampelt et al., 2012). Eine direkte Disaggregationsaktivität konnte jedoch weder im Zytosol noch in Mitochondrien von Säugetieren verifiziert werden.

Die Funktion des mitochondrialen Chaperons Hsp90, Trap1 (engl.: tumor necrosis factor receptor-associated protein 1), ist noch nicht ausreichend bekannt, jedoch deuten Studien auf eine schützende Rolle von Trap1 bei der ROS-Produktion und der damit verbundenen Apoptose hin (Altieri et al., 2012).

Proteine, die durch das Chaperonsystem nicht erfolgreich zurückgefaltet werden können, werden durch das mitochondriale Proteasesystem abgebaut, welches unabhängig vom zytosolischen Ubiquitin-Proteasom-System verläuft. In der Matrix humaner Mitochondrien befinden sich zum einen die löslichen Proteasen Lon und ClpXP, die für

die Degradation löslicher Substrate verantwortlich sind, und zum anderen die in die Innenmembran integrierten Proteasen, welche Membranproteine abbauen (Voos, 2013). Die mitochondrialen Proteasen gehören zu der AAA+ ATPase Proteinfamilie. Die lösliche Lon-Protease stellt die Hauptprotease in der mitochondrialen Matrix dar, welche unter Normalbedingungen frisch importierte Polypeptide abbaut, sofern diese die Faltung in ihre native Form verfehlen. Des Weiteren werden denaturierte oder durch reaktive Sauerstoffspezies beschädigte Proteine durch die Lon-Protease proteolytisch abgebaut (Ngo & Davies, 2007). Die zweite ATP-abhängige Protease der Matrix ClpXP besteht aus zwei Polypeptiden, der proteolytischen Untereinheit ClpP sowie der Untereinheit ClpX, welche einen Komplex aus zwei gestapelten Ringen bilden (Kang et al., 2005). Die physiologische Bedeutung von ClpXP in Mitochondrien ist derzeit noch nicht bekannt. Die membrangebundenen AAA-Proteasen, welche in der inneren Membran verankert sind und entweder in die Matrix oder den Intermembranraum hineinreichen, sind in erster Linie für den Abbau nicht assemblierter Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe verantwortlich (Korbel et al., 2004).

2.3.2 Mitochondrien-spezifische Stressantwort

Zellen reagieren auf verschiedene Stressbedingungen wie erhöhte Temperaturen oder Oxidanzien, die in der Akkumulation ungefalteter Proteine resultieren, mit der Induktion der Hitzeschockantwort (engl.: heat shock response (HSR)). Diese führt zur Expression von Genen, welche Hitzeschockelemente in ihrem Promotor beinhalten, die durch Transkriptionsfaktoren aktiviert sind (Morimoto, 1998). Die Hitzeschockantwort ermöglicht es Zellen, unter Stress mit der erhöhten Synthese von Hitzeschockproteinen zu antworten und so Proteinschäden zu reparieren (Lindquist, 1986). Die zytosolische Hitzeschockantwort wird durch den Transkriptionsfaktor HSF1 (engl.: heat shock factor 1) reguliert. Unter physiologischen Bedingungen wird die Transkriptionsaktivität des Faktors durch die Bindung von zytosolischem Hsp70 gehemmt. Treten jedoch aufgrund von Stress vermehrt ungefaltete Proteine im Zytosol auf, bindet Hsp70 diese und freigesetztes HSF1 kann im Kern die Expression von Genen, welche eine HSF1 Bindestelle enthalten, aktivieren. Zu diesen zählen beispielsweise die zytosolischen Chaperone Hsp70 und Hsp90 (Shi et al., 1998). Zellen sind zudem in der Lage, spezifisch auf Stress in bestimmten Organellen zu reagieren. Im Endoplasmatischen Retikulum (ER) ist dieser Mechanismus bereits seit längerem beschrieben. Dieser wird als „Antwort auf ungefaltete Proteine“ (engl.: unfolded protein response (UPR)) bezeichnet und beinhaltet die

Aktivierung von Signaltransduktionswegen als Antwort auf die Ansammlung ungefalteter Proteine im ER Lumen (Ron & Walter, 2007). In Mitochondrien konnte dieser Mechanismus ebenfalls beschrieben werden (UPR^{mt}), bei welchem die Expression von Proteasen, Chaperonen und anderer Stressgene als Antwort auf Stressbedingungen aktiviert wird. Wenn das Stresslevel die Kapazität des mitochondrialen Proteinqualitätskontrollsystems überschreitet, so wird dieses von den Mitochondrien an den Nukleus retrograd kommuniziert, um die Expression von Proteinqualitätskomponenten zu fördern und so die Funktion der Mitochondrien zu stabilisieren (Quiros et al., 2016). Die Regulation der mitochondrialen UPR ist am besten in *Caenorhabditis elegans* untersucht. Hier spaltet die Matrixprotease ClpXP aufgrund von Stress ungefaltete Proteine proteolytisch in Peptide. Diese werden durch HAF1-Transporter in das Zytoplasma transportiert und aktivieren hier den Transkriptionsfaktor ATFS-1 (Haynes et al., 2010; Nargund et al., 2012). ATFS-1 besitzt eine N-terminale mitochondriale Importsequenz und wird konstitutiv in gesunde Mitochondrien importiert, wo er durch die Lon-Protease degradiert wird. Zudem besitzt ATFS-1 eine C-terminale nukleäre Lokalisationssequenz. Ist der mitochondriale Import aufgrund von Stressbedingungen beeinträchtigt, wird der Transkriptionsfaktor nicht mehr in die Mitochondrien importiert, sondern akkumuliert stattdessen im Zytosol und wandert in den Kern, wo er zusammen mit weiteren Komponenten die Transkription Mitochondrien-spezifischer Gene aktiviert (Pellegrino & Haynes, 2015). Die Regulation der UPR^{mt} in Säugetieren hingegen ist noch nicht vollständig beschrieben. Es konnte jedoch ebenfalls gezeigt werden, dass die Ansammlung ungefalteter Proteine innerhalb der mitochondrialen Matrix in einer verstärkten Transkription nukleärer Gene, welche für mitochondriale Hitzeschockproteine wie Hsp60 und Hsp10 kodieren, resultiert. Dies erfolgt über die Hochregulation des Transkriptionsaktivatoren CHOP, C/EBP β und ATF5, welche Gene der mitochondrialen Homöostase regulieren (Qureshi et al., 2017; Zhao et al., 2002). Während CHOP und C/EBP β wahrscheinlich stressbedingt durch den Transkriptionsfaktor c-Jun induziert werden (Topf et al., 2016), erfolgt die Regulation von ATF5, vergleichbar mit der von ATFS-1 in *C. elegans*, über die Translokation von den Mitochondrien in den Zellkern (Fiorese et al., 2016).

2.3.3 Mitochondriale Dynamik

Das mitochondriale Netzwerk besitzt eine dynamische Struktur, welche sich durch Spaltung (engl.: fission) sowie Fusion (engl.: fusion) von Mitochondrien auszeichnet und

zur Aufrechterhaltung einer gesunden Mitochondrienpopulation in der Zelle beiträgt (Tatsuta & Langer, 2008). Die Funktionalität geschädigter Mitochondrien kann durch die Fusion mit intakten Mitochondrien wieder hergestellt werden. Hierbei kann geschädigtes Material, wie zum Beispiel mitochondriale DNA, ersetzt werden und so zur Integrität des gesamten Mitochondriennetzwerkes einer Zelle beitragen (Detmer & Chan, 2007). Die Abspaltung einzelner Mitochondrien vom mitochondrialen Netzwerk hingegen ermöglicht die Sequestration irreversibel geschädigter Mitochondrien und den darauffolgenden Abbau durch die Mitochondrien-spezifische Autophagie (Mitophagie) zum Schutz der übrigen Mitochondrienpopulation einer Zelle (Kim et al., 2007).

2.3.4 Mitophagie

Beschädigte oder überflüssige Mitochondrien, die vom mitochondrialen Netzwerk separiert und abgeschnürt werden, können selektiv als ganzes Organell durch eine spezifische Form von Autophagie, der Mitophagie, abgebaut werden (Wang & Klionsky, 2011). Autophagie ist ein intrazelluläres Degradationssystem, welches zytoplasmatische Proteine sowie Organellen abbaut. Hierbei werden die zellulären Komponenten in einer Doppelmembranstruktur, dem Autophagosom, eingeschlossen und mit dem Lysosom zum endgültigen Verdau fusioniert. Im Gegensatz zu diesem unselektiven Abbau, der unter Hungerbedingungen induziert wird, um die Zelle mit essenziellen Nährstoffen zu versorgen, handelt es sich bei der Mitophagie um einen regulierten, selektiven Mechanismus (Youle & Narendra, 2011). In menschlichen Mitochondrien konnten drei unterschiedliche Wege der Mitophagie identifiziert werden: (1) Das Entfernen von Mitochondrien in der Retikulozytenentwicklung, (2) die selektive Elimination paternaler Mitochondrien in befruchteten Eizellen und (3) die Degradation geschädigter Mitochondrien. Obgleich alle drei Mitophagiewege die gleichen Hauptelemente der Autophagiemaschinerie verwenden, verläuft deren Initiation unterschiedlich. In Hefe rekrutiert das mitochondriale Außenmembranprotein Atg32 (engl.: autophagy-related gene 32) die Autophagosomenmembran zu den Mitochondrien (Kanki & Klionsky, 2010), wohingegen in Säugetieren das Protein der äußeren Mitochondrienmembran Nix (engl.: NIP3-like protein X) die Degradation der Mitochondrien in der Reifung der roten Blutkörperchen vermittelt (Schweers et al., 2007). Das Entfernen geschädigter Mitochondrien in Säugetierzellen wird hingegen durch den PINK/Parkin-Signalweg vermittelt. Bei diesem Mechanismus markiert PINK (engl.: PTEN-induced putative protein kinase 1) geschädigte Mitochondrien, indem es auf der mitochondrialen

Außenmembran akkumuliert und die zytosolische E3 Ubiquitin Ligase Parkin rekrutiert. Die geschädigten Mitochondrien werden durch die Parkin-vermittelte Ubiquitinierung der mitochondrialen Proteine für die Degradation durch Autophagie markiert (Ashrafi & Schwarz, 2013). Mutationen der Gene für PINK und Parkin wurden in der familiären, autosomal rezessiven Parkinsonerkrankung nachgewiesen, bei welcher Defekte in der Mitophagie vorherrschen (Youle & Narendra, 2011).

2.4 Proteinaggregation

Für die Funktionalität eines Proteins ist eine korrekte Faltung zur dreidimensionalen nativen Form notwendig. Die Faltung der Proteine beginnt nach der Neusynthese am Ribosom über verschiedene strukturelle Zwischenstufen hin zu ihrer funktionellen Konformation. Bei diesen Zwischenstufen im Verlauf der Proteinfaltung liegen hydrophobe Aminosäureseitenketten, welche sonst im Inneren der nativen Proteinstruktur geschützt sind, exponiert auf der Oberfläche vor. Dies erhöht die Gefahr der Bildung von Proteinaggregaten (Balchin et al., 2016; Tyedmers et al., 2010). Doch auch nativ gefaltete Proteine können anfällig für Fehlfaltungen sein, welche durch verschiedene Stressbedingungen ausgelöst werden können: (1) Umweltstress wie Hitzestress, oxidativer Stress, Schwermetalle oder toxische Chemikalien, (2) Mutationen, die eine Konformationsänderung des Proteins nach sich ziehen, (3) Defekte in der Proteinbiosynthese, zum Beispiel durch das Einfügen falscher Aminosäuren oder (4) eine fehlerhafte Assemblierung von Proteinkomplexen (Tyedmers et al., 2010).

Das mitochondriale Proteinqualitätskontrollsystem kann, wie oben beschrieben, auf das Auftreten fehlgefalteter Proteine reagieren. Wird dessen Kapazität jedoch überschritten, zum Beispiel aufgrund anhaltender Stressbedingungen oder einer verringerten Proteinqualitätskontrolle in gealterten Zellen (Hipp et al., 2014), kann es zu Ansammlungen von Proteinaggregaten kommen, die eine potenzielle Bedrohung für die gesamte Zelle darstellen. Proteinaggregate können verschiedene Strukturen ausbilden: (1) ungeordnete, amorphe Aggregate, (2) kleine oligomere Proteinaggregate, welche aus wenigen (meist weniger als 50) teilweise ungefalteten Untereinheiten bestehen (Vetri & Fodera, 2015) und (3) große, geordnete amyloide Fibrillen, welche aus akkumulierten Oligomeren entstehen. Die Strukturen unterscheiden sich in ihrem Anteil an β -Faltblättern, welcher bei amyloiden Fibrillen am höchsten ist (Tyedmers et al., 2010). Die Toxizität der Aggregate für die Zelle resultiert zum einen aus dem Funktionsverlust der aggregierten Proteine und zum anderen aus der Struktur der Oligomere im Prozess der

Aggregatbildung. Diese besitzen aufgrund hydrophober Aminosäurereste eine „klebrige“ Oberfläche, welche Interaktionen mit anderen Proteinen und somit deren Aggregation begünstigt (Balchin et al., 2016; Chiti & Dobson, 2017). Die kleinen oligomere Proteinaggregate weisen somit eine höhere Toxizität auf als große Aggregatakkumulationen, so dass die Bildung amyloider Fibrillen eine Schutzfunktion für die Zelle darstellt (Tyedmers et al., 2010).

Amyloide Proteinaggregationen stehen mit verschiedenen Erkrankungen in Verbindung, wie zum Beispiel das Beta-Amyloid Peptid und Tau beim Morbus Alzheimer, α -Synuklein beim Morbus Parkinson und Huntingtin bei der Chorea Huntington (Chiti & Dobson, 2017; Selkoe, 2003). Die chronische Expression von Proteinen, welche anfällig für Aggregation sind, führt, besonders in gealterten Zellen, zu einer Überlastung der Proteinhomöostase in der Zelle und somit zu weiterer Fehlfaltung und Aggregation metastabiler Proteine (Hipp et al., 2014; Labbadia & Morimoto, 2015).

Über das stressbedingte Aggregationsverhalten mitochondrialer Proteine ist derzeit noch nicht viel bekannt. Studien in *S. cerevisiae* haben eine temperaturabhängige Aggregation und somit Inaktivierung metabolischer Schlüsselenzyme in Mitochondrien nachweisen können, welche durch mitochondriale Chaperone und die Pim1/Lon-Protease vor stressinduzierter Aggregation geschützt werden können (Bender et al., 2011). Des Weiteren zeigte eine Untersuchung altersbedingter Proteinaggregate in *C. elegans*, dass vor allem mitochondriale Proteine eine geringere Löslichkeit im Alter aufweisen, was die mitochondriale Proteinaggregation mit altersbedingten Krankheiten in Verbindung bringt (David et al., 2010).

2.4.1 Schutzmechanismen gegen Aggregation

Ist das Proteinqualitätssystem nicht in der Lage, aggregierte Proteine abzubauen oder zurück zu falten, so kann die Sequestration in spezielle Kompartimente einen Schutz der Zelle vor potenziell schädigenden Aggregaten darstellen. Die unterschiedlichen Ablagerungsmechanismen von Proteinaggregaten in eukaryotischen Zellen wurden am besten in *S. cerevisiae* beschrieben. Hier werden unlösliche, aggregierte Proteine, wie amyloide Aggregate, in Kompartimenten abgelagert, welche an die Vakuole angrenzen und als IPOD (engl.: insoluble protein deposit) bezeichnet werden. Für die Lagerung löslicher, ungefalteter Proteine wurden verschiedene Kompartimente beschrieben. Kaganovich stellte das Modell auf, dass ungefaltete, ubiquitinierte Proteine, die als Substrate für den proteasomalen Abbau dienen, im Zytosol in Kompartimenten

akkumulieren, welche an die Kernmembran angrenzen und als JUNQ (engl.: juxtanuclear quality-control compartment) bezeichnet werden (Kaganovich et al., 2008). Im Gegensatz dazu definierten Miller et al. 2015 zwei unterschiedliche Kompartimente, in denen fehlgefaltete Proteine, unabhängig von der Ubiquitinierung, akkumulieren. Zum einen das intranukleäre Kompartiment INQ (engl.: intranuclear quality-control compartment), in welchem sowohl nukleäre als auch zytosolische fehlgefaltete Proteine gelagert werden und zum anderen das zytosolische Kompartiment CytoQ (engl.: cytosolic quality-control compartment). Die Hitzeschockproteine Btn2 (Nukleus) und Hsp42 (Zytosol) vermitteln hierbei die Ablagerung der Aggregate in den jeweiligen Kompartimenten (Miller et al., 2015). Des Weiteren konnte in *S. cerevisiae* ein Mitochondrien-spezifisches Qualitätskontrollkompartiment nachgewiesen werden, in welchem fehlgefaltete Reporter-Polypeptide sowie endogene Proteine, die unter Stressbedingungen aggregieren, abgelagert werden. Die Bildung dieser sogenannten IMiQ (engl.: intra-mitochondrial quality-control compartment) stellt einen Schutzmechanismus der Mitochondrien vor potenziell toxischen Proteinaggregaten dar (Bruderek et al., 2018).

In Säugetierzellen wurden ebenfalls JUNQ- und IPOD-ähnliche Kompartimente beschrieben (Kaganovich et al., 2008). Des Weiteren akkumulieren fehlgefaltete Proteine in Mammaliazellen in sogenannten Aggresomen (Johnston et al., 1998), einer Spezialform der ebenfalls in Bakterien vorkommenden Inklusionskörper. Diese perinukleären Kompartimente, in welchen fehlgefaltete, ubiquitinierte Proteine abgelagert werden, sind an einer Einbuchtung der Kernhülle am Mikrotubuli-organisierenden-Zentrum (engl.: microtubule-organizing centre (MTOC)) lokalisiert (Kopito, 2000). Der Transport von Aggregaten aus der Peripherie der Zelle zum Aggresom wird über das Adaptorprotein Histontransacetylase 6 (HDAC6) vermittelt, welche die polyubiquitinierten Ketten der ungefalteten Proteine mit dem Mikrotubulimotorprotein Dynein verbindet und so den Transport entlang der Mikrotubuli zum MTOC ermöglicht (Kawaguchi et al., 2003). Aggresomen sind sowohl mit Chaperonen als auch mit Komponenten des Ubiquitin-Proteasom-Systems assoziiert und sind von Intermediärfilamentproteinen wie Vimentin umgeben (Garcia-Mata et al., 2002; Johnston et al., 1998). Des Weiteren können Aggresomen durch Autophagie abgebaut werden, was die selektive Beseitigung der potenziell toxischen Proteinaggregate für die Zelle ermöglicht (Olzmann et al., 2008).

2.4.2 Stress-Granules

Als Antwort auf Stressbedingungen kann im Zytosol eukaryotischer Zellen zudem die Initiation der Translation inhibiert werden, was zu der Bildung zytoplasmatischer RNA-Protein Komplexe führt, welche als Stress-Granules bezeichnet werden. Dieser Mechanismus schützt das zytosolische Proteinqualitätskontrollsystem unter Stressbedingungen vor einer Überlastung durch neu synthetisierte Polypeptide (Buchan & Parker, 2009). In Säugetieren führt die Blockierung der Translationsinitiation zur Bildung von Stress-Granules, welche aus nicht-translatierter mRNA, RNA-bindenden Proteinen, Translationsinitiationsfaktoren und 40S-ribosomalen Untereinheiten bestehen (Kedersha et al., 1999). Die Hauptursache für die Inhibition der Translationsinitiation ist die stress-induzierte Phosphorylierung des eukaryotischen Translationsinitiators eIF2 α durch Serin/Threonin Kinasen (Panas et al., 2016). Somit ist die Neubildung von Proteinen, mit Ausnahme der Synthese von Hitzeschockproteinen, blockiert. Erholt sich die Zelle von der Stressbedingung, können Stress-Granules teilweise disassembliert werden, was zu einer Wiederherstellung der Translation führt (Buchan & Parker, 2009). Die Inhibierung der Translation als Folge von Stressbedingungen und die Bildung von Stress-Granules wurden lediglich für das Zytosol, jedoch nicht für die Mitochondrien, dem zusätzlichen Ort der Translation, beschrieben.

3 Ziel der Arbeit

Forschungen der letzten Jahrzehnte haben bereits viel Einblick in die Hitzeschockantwort der Zelle in Bezug auf die Expression nukleär kodierter Proteine sowie die Bildung von Stress-Granules im Zytosol gebracht. Wesentlich weniger ist hingegen über den Einfluss von proteotoxischen Stressbedingungen auf das mitochondriale Proteom bekannt. Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss von Stress auf die Funktion von Mitochondrien zu untersuchen sowie Proteine, die zur Aggregation neigen, zu identifizieren. Wichtige Fragen dieser Arbeit waren somit:

Welche funktionellen sowie morphologischen Auswirkungen sind in Säugetiermitochondrien unter Stressbedingungen zu beobachten?

Welche mitochondrialen Proteine haben die Tendenz unter Einfluss von Stress zu aggregieren?

Welche Schutzmechanismen haben Mitochondrien, um proteotoxischem Stress entgegenzuwirken?

Als erster Ansatz wurden sowohl HeLa Zellen als auch intakte isolierte Mitochondrien verschiedenen Stressbedingungen ausgesetzt und generelle morphologische sowie funktionelle Auswirkungen auf die Mitochondrienpopulation der Zelle bestimmt. Hier wurden neben der Bestimmung des Membranpotenzials und der Bildung oxidativen Stresses, ebenso der ATP-Gehalt der Mitochondrien sowie die Enzymaktivität mitochondrialer Schlüsselenzyme untersucht. Weiterführend wurden die Proteine, welche unter Hitzestress zur Aggregation neigten mit Hilfe der quantitativen Proteomanalyse identifiziert. Hierfür wurden Mitochondrien hohen physiologischen Temperaturen ausgesetzt, um die Proteinaggregation zu induzieren. Veränderungen der Proteinlöslichkeit wurden mittels zweidimensionaler Differenz-Gelelektrophorese (2D-DIGE) charakterisiert. Die quantitative Auswertung der Proteinspotmuster sowie die Analyse der Proteine mittels Massenspektrometrie ermöglichte die Identifikation temperatursensitiver Proteine. In weiterführenden Experimenten wurde das Aggregationsverhalten jener thermolabilen Proteine unter verschiedenen Stressbedingungen nachgewiesen und im Detail analysiert. Abschließend wurde der Einfluss von Hitzestress auf die funktionelle Integrität von Mitochondrien unter *in organello* Bedingungen betrachtet, indem die mitochondriale Translation sowie die Importeffizienz nach Hitzestress bestimmt wurden. Mit Hilfe der gewonnen Ergebnisse dieser Arbeit sollte ein Modell aufgestellt werden, welches die mitochondriale Antwort auf proteotoxischen Stress beschreibt.

4 Materialien und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Laborgeräte

Gerät	Name	Hersteller
CCD Kamera	LAS-400 mini	Fujifilm
Durchflusszytometer	CyFlow space CY-S3001	Partec
Elektrophorese System	Ettan DALTsix	GE Healthcare
Fluoreszenzmikroskop	EVOS fl	PeqLab
Isoelektrisches Fokussierungssystem	Ettan IPGphor 3	GE Healthcare
Mikroplattenleser	Infinite M200 pro	TECAN
Phosphoimager	FLA-5100	Fujifilm
Ultrazentrifuge	Optima Max-XP	Beckman Coulter
Vakuum-Konzentrator	Scan Vac	LaboGene
Zellzähler	Scepter	Millipore

4.1.2 Chemikalien

Name	Hersteller
Apyrase	Sigma-Aldrich
Adenosintriphosphat (ATP)	Carl Roth
AVO (Valinomycin, Antimycin A, Oligomycin)	Sigma-Aldrich
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich
Cycloheximid	Sigma-Aldrich
Coenzym A	Sigma-Aldrich
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich
Digitonin	Calbiochem
Guanosintriphosphat (GTP)	Carl Roth
Kreatin	Roche
Kreatinkinase	Roche

Kreatinphosphat	Sigma-Aldrich
Menadion	Sigma-Aldrich
Nicotinamidadenindinukleotid (NADH)	Carl Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth
Proteinase K	Sigma-Aldrich
Protease Inhibitor Cocktail Plus	Carl Roth
Tetramethylrhodaminmethylester (TMRE)	Life technologies
Thiaminpyrophosphat	Sigma-Aldrich

4.1.3 Reagenzien

Name	Hersteller
ATP Determination Kit	Invitrogen
CyDye DIGE Flour Minimal Dyes	GE Healthcare
EXPRESS [³⁵ S] Protein Labeling Mix	Perkin Elmer
Immobilinstreifen (pH 3-11)	GE Healthcare
MitoSOX Mitochondrial Superoxide Indicator	Life technologies
Pharmalyte TM 3-11 NL	GE Healthcare
Proteinmarker NativeMark TM	Invitrogen
Proteinmarker Roti [®] -Mark	Carl Roth
Rabbit Reticulocyte Lysate System	Promega
Roti [®] -Quant Bradfordreagenz	Carl Roth
ServaLight EoSUltra CL HRP WB Substrate Kit	Serva
T _N T [®] T7/T3 Coupled Reticulocyte Lysate Kit	Promega

4.1.4 Zellkultur Medien und Reagenzien

Name	Hersteller
RPMI Medium	Life technologies
Fetales Kälberserum (FKS)	Life technologies
Penicillin/Streptomycin	Life technologies
L-Glutamin	Life technologies
0,005 % Trypsin-EDTA	Life technologies
10 x PBS (phosphate buffered saline)	Life technologies

4.1.5 Mammalia Zelllinie

Name	Beschreibung	Hersteller
HeLa	Humanes Cervixkarzinom	DSMZ, ACC-57

4.1.6 Primärantikörper

Immunogen	Typ	Spezifikation	Hersteller
Aco2	Hase	HP001097	Sigma
Cox4 (Komplex IV)	Hase	3E11	Cell Signaling
F1ß (Komplex V)	Maus	A21351	Invitrogen
Hsp60	Hase	sc-13966	Santa Cruz Biotechnology
Lon	Hase	GR1048	Gramsch
Mdh2	Hase	D8Q5S	Cell Signaling
Mpp	Maus	sc-390471	Santa Cruz
Mrpl38	Hase	HPA023054	Sigma
Ndufa9 (Komplex I)	Maus	459100	Invitrogen
Sdha (Komplex II)	Maus	459200	Invitrogen
Sdha	Hase	14865-1-AP	Proteintech
Sod2	Hase	S5569	Sigma
Tim23	Maus	611222	BD Biosciences
Tsfm	Hase	11701-1-AP	Proteintech

Tufm	Hase	HPA024087	Sigma
Trap1	Hase	GR2387	Gramsch
Uqcrc2 (Komplex III)	Maus	-	AG Kunz
Vdac	Hase	4866	Cell Signaling

4.1.7 Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper

Immunogen	Typ	Spezifikation	Hersteller
Hase IgG	Ziege	A6154	Sigma-Aldrich
Maus IgG	Ziege	A4416	Sigma-Aldrich

4.1.8 Fluoreszenz-gekoppelte Sekundärantikörper

Immunogen	Typ	Spezifikation	Hersteller
Maus IgG Alexa Fluor® 488	Ziege	A11001	Invitrogen
Hase IgG Alexa Fluor® 594	Ziege	A11012	Invitrogen

4.1.9 Plasmide

Name	Beschreibung	Hersteller
pTUFm	Vektor: pCMV6-AC, Insert: humanes Tufm, T7 Promotor für <i>in vitro</i> Transkription	OriGene
SU9(70)DHFR	Vektor: pGEM3Z; Insert: Su9(1-70)-DHFR von <i>M. musculus</i> , SP6 Promotor für <i>in vitro</i> Transkription	AG Voos
Trap1	Vektor: pOTB7, Insert: humanes Trap1, SP6 Promotor für <i>in vitro</i> Transkription	Invitrogen
Mdh2	Vektor: pOTB7, Insert: humanes Mdh2, SP6 Promotor für <i>in vitro</i> Transkription	Invitrogen

4.2 Methoden

4.2.1 SDS-PAGE

Standardmäßig wurden Proteine durch diskontinuierliche SDS-PAGE (engl.: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) gemäß ihrer Molekülmasse auf einem 10 %- oder 12,5 %-igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Probe wurden in 1x Lämmli Probenpuffer (2 % SDS (w/v), 10 % Glycerin, 60 mM Tris/HCl, pH 6, 0,02 % Bromphenolblau, 5 % β -Mercaptoethanol) gelöst und bei 95 °C für 5 min erhitzt. Die Elektrophorese wurde in 1x SDS-Puffer (25 mM Tris, 0,191 mM Glycerin) bei 30 mA für 3 h durchgeführt.

	Trenngel		Sammelgel
	10 %	12,5 %	
Acrylamid/ Bisacrylamid (30:0,8) Mix [ml]	5,7	6,9	0,83
1,875 M Tris/HCl pH 8,8 [ml]	3,5	3,5	-
0,8 M Tris/HCl pH 6,8 [ml]	-	-	0,5
10 % [w/v] SDS [μ l]	170	170	50
ddH ₂ O [ml]	7,5	6,3	3,55
10 % [w/v] APS [μ l]	100	100	50
TEMED [μ l]	10	10	10
Total [ml]	17	17	5

4.2.2 Blue native PAGE

Die Atmungskettenkomplexe wurden mit Hilfe der Blauen Nativ-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Blue native PAGE) analysiert. 40 μ g frisch isolierte HeLa Mitochondrien wurden nach erfolgten Hitzeschock in Digitonin-Lysis-Puffer (0,4 % (w/v) Digitonin, 50 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7,4, 2 mM EDTA, pH 8,0, 1 mM PMSF, 10 % (v/v) Glycerol) durch Auf- und Abpipettieren (20x) und anschließendem Schütteln für 10 min bei maximaler Geschwindigkeit (4 °C) lysiert. Die Proben wurden mit 10x Ladepuffer (5 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G-250, 500 mM ϵ -Aminocaprinsäure, 100 mM Bis-Tris/HCl pH 7,0) versetzt und auf ein 5-15 %igen Polyacrylamid

Gradientengel aufgetragen. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte in vorgekühltem (4 °C) Anodenpuffer (50 mM Bis-Tris/HCl, pH 7,0). Die Proben wurden mit Kathodenpuffer mit Coomassie (50 mM Tricin/HCl, pH 7,0, 15 mM Bis-Tris/HCl, pH 7,0, 0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G-250) überschichtet, welcher durch Kathodenpuffer ohne Coomassie ausgetauscht wurde, sobald die Lauffront das Trenngel erreichte. Die Elektrophorese wurde bei 4 °C bei 70 V für 16-20 h durchgeführt. Das Gel wurde für 5 min in 1x SDS Puffer inkubiert, bevor es mittels Western Blot (siehe unten) analysiert wurde.

	5 %	16,5 %	Sammelgel
3x Gelpuffer (200 mM ϵ -Aminocapronsäure, 150 mM Bis-Tris/HCl pH 7,0) [ml]	3	3	2,5
Acrylamid/Bisacrylamid (32:1) Mix [ml]	0,91	3,05	0,6
Glycerol [ml]	-	1,8	-
ddH ₂ O [ml]	5,048	1,117	4,367
10 % APS [μ l]	38	30	30
TEMED [μ l]	3,8	3	3
Total [ml]	9	9	7

4.2.3 Western Blot

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diese auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran mittels der Semi-Dry Western Blot Methode transferiert. Der Transfer der Proteine erfolgte in Transferpuffer (20 mM Tris, 150 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol) bei 220 mA für 2 h. Zum Anfärben der Proteine wurde die Membran in Coomassie-Färbelösung (0,5 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250, 40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure) inkubiert und mittels Entfärberlösung (40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure) wieder entfärbt. Die Membran wurde für 1 h in Blockierlösung (5 % (w/v) Milch, 0,5 % (v/v) Tween 20 in TBS-Puffer (Tris Buffered Saline, 20 mM Tris/HCl pH 7,4, 150 mM NaCl) oder Deko Salt-Puffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl)) inkubiert und anschließend über Nacht mit der Primärantikörperverdünnung (1:500-1:200 in TBS- oder Deko Salt-Puffer, 0,5 % (v/v) Tween 20) inkubiert. Die Inkubation mit dem Anti-Maus oder Anti-Hase IgG Antikörper, welcher an der Meerrettichperoxidase gekoppelt vorlag, erfolgte für 1 h bei

Raumtemperatur. Nach jedem Inkubationsschritt folgte das dreimalige Waschen in TBS- bzw. Deko Salt-Puffer. Die Membranen wurden mittels eines Chemilumineszenz-Substrats (ServaLight EoSUltra) entwickelt und die Lumineszenz mit einer CCD (engl.: Charge Coupled Device) detektiert.

4.2.4 TCA Fällung von Proteinen

Um die Proteine einer Lösung auszufällen, wurde 72 %igen Trichloressigsäure (TCA) hinzugegeben (1/5 des Endvolumens) und gründlich durchmischt. Die Proben wurden 35 min oder über Nacht bei 4 °C inkubiert und anschließend bei 20 000 xg für 35 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Proben wurden zweimal mit eisgekühltem Aceton gewaschen und die getrockneten Zellpellets in 1x Lämmli Probenpuffer resuspendiert.

4.2.5 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Test

Die Proteinmenge wurde mittels des Bradford-Tests bestimmt. 2 µl der jeweiligen Probe oder des Proteinstandards, welcher aus verschiedenen Konzentrationen (0-2 mg/ml) von BSA (Bovine Serum Albumin) bestand, wurden mit 200 µl Bradford Reagenz in einer 96-Well Platte gemischt, 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und die Absorption bei 595 nm im Mikroplattenlesegerät detektiert.

4.2.6 *In vitro* Transkription und Translation

Die radioaktiv markierte Substratproteine SU9-DHFR, Tufm, Trap1 und Mdh2, welche für den *in vitro* Import (siehe unten) verwendet wurden, wurden durch gekoppelte Transkription und Translation mittels des T_NT[®] T7/T3 Coupled Reticulocyte Lysate Kit (Promega) hergestellt. Die Translation erfolgte mittels Retikulozytenlysat aus Hasen in Gegenwart von [³⁵S]-Methionin/Cystein.

4.2.7 Zellkulturbedingungen

HeLa Zellen wurden in RPMI-Medium (engl.: Roswell Park Memorial Institute Medium) nach Zugabe von 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (FKS), 2 mM L-Glutamin, 100 Units/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Die Zellen wurden in 10 cm oder 15 cm Petrischalen bei 37 °C und 5 % CO₂ gezüchtet und regelmäßig im Verhältnis 1:3 bis 1:6 alle 48-72 h mittels Trypsinierung passagiert.

4.2.8 Hitzeschock

4.2.8.1 Hitzeschock adhärenter HeLa Zellen in Zellkultur

Adhärente HeLa Zellen wurden durch den Wechsel mit 45 °C vorgewärmtem Medium und einer Inkubation von 2-2,5 h bei 45 °C im Inkubator hitzestressiert. Die Kontrollproben verblieben jeweils bei 37 °C im Inkubator.

4.2.8.2 Hitzeschock isolierter Mitochondrien aus HeLa Zellen

Isolierte Mitochondrien aus HeLa Zellen (siehe 4.2.12), wurden in Resuspensionspuffer (500 mM Sucrose, 160 mM KAc, 40 mM HEPES/KOH, pH 7,6, 10 mM MgAc, 5 mM Glutamat, 5 mM Malat, 1 mM DTT) resuspendiert (30 µg Mitochondrien/100 µl Resuspensionspuffer) aufgelöst und bei verschiedenen Temperaturen (25 °C, 37 °C, 42 °C oder 45 °C) für 20 min im Thermomixer inkubiert.

Für die Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Aggregation nach Hitzestress wurden Mitochondrien für 0-60 min bei 42 °C sowie 25 °C (Kontrolle) inkubiert.

4.2.9 Oxidativer Stress

4.2.9.1 Oxidativer Stress adhärenter HeLa Zellen in Zellkultur

Kultivierte HeLa Zellen wurden durch den Wechsel mit Medium, welches 0,5 mM Menadion und einer 90-minütigen Inkubation bei 37 °C oxidativem Stress ausgesetzt. Die Kontrollprobe wurde parallel mit der entsprechenden Menge Ethanol inkubiert.

4.2.9.2 Oxidativer Stress isolierter Mitochondrien aus HeLa Zellen

30 µg isolierte Mitochondrien aus HeLa Zellen (siehe 4.2.12) wurden in 100 µl Resuspensionspuffer gelöst und bei verschiedenen Menadionkonzentrationen (0,5 mM, 1 mM, 2 mM) für 20 min bei 25 °C im Thermomixer inkubiert.

4.2.10 Immunzytochemie

Für die fluoreszenzmikroskopische Analyse von fixierten HeLa Zellen wurden 3×10^4 Zellen pro Well in einer 24-Well Platte ausgesät und über Nacht kultiviert, um die Anlagerung der adhärenen Zellen an die Deckgläschen, welche sich am Boden der Wells befanden, zu ermöglichen. Für die Untersuchung der Zellen nach Hitzestress wurden diese für 2 h bei 37 °C oder 45 °C im Inkubator inkubiert. Für die Analyse von HeLa Zellen, welche mit Plasmid-DNA transfiziert wurden, erfolgte die im Folgenden beschriebene Prozedur nach der 48-stündigen Transfektion. Das Medium wurde entfernt und die Zellen

für 5 min bei 37 °C in Fixierlösung (4 % (w/v) Paraformaldehyd, 10 % (w/v) Sucrose in 1x PBS-Puffer (Phosphate-Buffered Saline), pH 7,2) inkubiert und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur mittels Permeabilisierungslösung (0,5 % (v/v) Triton X-100 in PBS-Puffer, pH 7,2) permeabilisiert. Die Deckgläschen wurden nach jedem Schritt 3x in PBS gewaschen. Nach einer einstündigen Inkubation in Blockierlösung (0,2 % (w/v) BSA in PBS, pH 7,2) wurden die Proben über Nacht mit verschiedenen Primärantikörpern (1:250 Verdünnung in Blockierlösung) bei 4 °C inkubiert. Die Primärantikörper wurden mittels Fluoreszenz-gekoppelter Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 (Ziege Anti-Maus IgG) sowie Alexa Fluor® 594 (Ziege Anti-Hase IgG) detektiert und gaben somit ein Fluoreszenzsignal für das jeweilige Protein. Die Mikroskopie-Bilder wurden mit dem EVOS_{FL} Cell Imaging System (Peqlab) mit einer 40x Objektivlinse erlangt.

4.2.11 Durchflusszytometrie

Für die Messung des mitochondrialen Membranpotenzials sowie der Bestimmung der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies nach Hitzestress mittels Durchflusszytometrie wurden HeLa Zellen für 2,5 h bei 45 °C hitzestressiert und mit Kontrollproben, welche bei 37 °C inkubiert wurden, verglichen. Als Negativkontrolle für Zellen ohne Membranpotenzial wurde eine Probe parallel mit Valinomycin (f. c. 0,1 µM) für 30 min bei 37 °C behandelt. Als Positivkontrolle für die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wurden Zellen für 15 min bei 37 °C mit 100 µM Menadion behandelt.

Zur Messung des mitochondrialen Membranpotenzials wurden Zellen für 10 min bei 37 °C mit 0,5 µM Tetramethylrhodaminmethylester (TMRE), einem Membranpotenzial-sensitiven Farbstoff, inkubiert. Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wurde durch die Verwendung des roten mitochondrialen Superoxidindikators MitoSOXTM (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Die Zellen wurden für 10 min bei 37 °C in Anwesenheit von MitoSOXTM inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Zellen trypsinisiert und zweimal gewaschen (1x PBS, 0,2 % (w/v) BSA). Die rote Fluoreszenz von 20,000 Zellen wurde für jede Probe mittels des Durchflusszytometers CyFlow Space CY-S3001 (Partec) gemessen.

4.2.12 Isolation von Mitochondrien

Mitochondrien wurden entweder direkt aus kultivierten HeLa Zellen, die von Petrischalen mittels eines Zellschabers geerntet wurden, oder aus eingefrorenen HeLa Zellen, welche durch Trypsinierung geerntet und anschließend bei -80 °C in Einfriermedium (RPMI

Medium, 20 % (v/v) FKS, 10 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO)) eingefroren wurden, isoliert. Die Zellen wurden zweimal in eiskalten 1x PBS gewaschen und in Lösung-A (220 mM Mannitol, 70 mM Sucrose, 10 mM HEPES/KOH, pH 7,6, 1 mM EDTA, 0,2 % (w/v) BSA, 1 mM PMSF) resuspendiert. Die Zellen wurden mittels eines Glas-/Teflon-Homogenisators aufgeschlossen. Die lysierten Zellen wurden von Zelltrümmern sowie nicht lysierten Zellen mittels Zentrifugation bei 1500 xg für 5 min bei 4 °C getrennt. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet erneut homogenisiert und lysierte Zellen wie oben beschrieben isoliert. Die Mitochondrien wurden aus den Überständen durch Zentrifugation bei 12 000 xg für 10 min bei 4 °C isoliert. Die Mitochondrienpellets wurden in Lösung-B (220 mM Mannitol, 70 mM Sucrose, 10 mM HEPES/KOH, pH 7,6, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF) gewaschen und Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 2000 xg (5 min, 4 °C) entfernt. Die Mitochondrien wurden reisoliert (12 000 xg, 10 min, 4 °C) und in Lösung-B resuspendiert. Die Menge isolierter Mitochondrien wurde durch die Proteinbestimmung mittels des Bradford-Tests (4.2.5) bestimmt.

4.2.13 Isolation aggregierter mitochondrialer Proteine nach Stress

Frisch isolierte HeLa Mitochondrien wurden in Resuspensionspuffer (500 mM Sucrose, 160 mM KAc, 40 mM HEPES/KOH, pH 7,6, 10 mM MgAc, 5 mM Glutamat, 5 mM Malat, 1 mM DTT) im Verhältnis 30 µg Mitochondrien zu 100 µl Puffer resuspendiert. Sofern angegeben, wurde ebenfalls eine Probe der Gesamtproteinmenge, welche Mitochondrien ohne Behandlung repräsentierte (Total), mitgeführt. Für die Untersuchung der Nukleotid-Abhängigkeit der Aggregation wurde der Resuspensionspuffer entweder mit 5 mM Adenosintriphosphat (ATP), und dem ATP-regenerierenden System (20 mM Kreatinphosphat, 4 µg/ml Kreatinkinase) oder 2,5 mM Guanosintriphosphat (GTP) ergänzt. Hitzestress sowie oxidativer Stress wurden wie oben beschrieben (4.2.8.2 und 4.2.9.2) durchgeführt.

Nach der jeweiligen Inkubation wurden die Mitochondrien durch Zentrifugation reisoliert (12 000 xg, 10 min, 4 °C) und die Mitochondrien in Lysispuffer (0,5 % (v/v) Triton X-100, 200 mM KCl, 30 mM Tris/HCl, pH 7,4, 0,5 mM PMSF, 1x Proteaseinhibitor) durch starkes Schütteln für 10 min bei 4 °C aufgeschlossen. Lösliche Proteine wurden von unlöslichen, aggregierten Proteinen durch Zentrifugation bei 20 000 xg (20 min, 4 °C) getrennt. Die löslichen Proteine im Überstand wurden mittels Trichloressigsäure (TCA) ausgefällt (siehe 4.2.4) und die aggregierten Proteine im Pellet mit 100 µl Lysispuffer durch erneutes 10-minütiges Schütteln reextrahiert. Nach einem zweiten

Zentrifugationsschritt (20 000 xg, 10 min, 4 °C) wurden die Überstände verworfen und die Pellets in 20 µl 1x Lämmli Probenpuffer resuspendiert. Die Gesamtproteinmenge (Total), die Überstände (Üb) und die Pellets (Pel) wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

4.2.14 Sedimentation von Aggregaten

Zur Untersuchung der Sedimentationseigenschaften von hitzeinduzierten Aggregaten wurden Mitochondrien für 20 min bei 25 °C (Kontrolle) und 42 °C (Stress) inkubiert und wie beschrieben lysiert. Um die Größe und Dichte der gebildeten Aggregate bestimmen zu können, wurden verschiedene Zentrifugationsschritte angewendet. Nach einem ersten niedrigen Zentrifugationsschritt bei 1600 xg für 5 min wurde der Überstand erneut bei 20 000 xg für 5 min und darauf folgend für 20 min bei derselben Drehzahl zentrifugiert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt hoher Drehzahl (125 000 xg, 40 min) wurden die Proteine des Überstands mit TCA gefällt. Die Pellets jedes Zentrifugationsschrittes wurden jeweils in 20 µl 1x Lämmli resuspendiert und durch SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

4.2.15 Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation

300 µg frisch isolierte Mitochondrien wurden in 1000 µl Resuspensionspuffer (500 mM Sucrose, 160 mM KAc, 40 mM HEPES/KOH, pH 7,6, 10 mM MgAc, 5 mM Glutamat, 5 mM Malat, 1 mM DTT) gelöst und bei 25 °C, 37 °C, 42 °C und 45 °C für 20 min inkubiert. Die Mitochondrien wurden reisoliert (12 000 xg, 10 min, 4 °C) und in Gradientenpuffer resuspendiert (0,6 M Sorbitol, 10 mM MOPS/KOH pH 7,2, 2 mM PMSF) und mit 1 % Digitonin lysiert.

Die Proben wurden auf einen 15-65 %igen Sucrosegredienten in Gradientenpuffer geladen und bei 200,000 xg für 1 h bei 4 °C zentrifugiert. Es wurden 500 µl Fraktionen (1-23) gesammelt und im Verhältnis 1:1 mit Gradientenpuffer verdünnt. Die Proben wurden mit TCA präzipitiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

4.2.16 Einfluss hoher Salzkonzentrationen auf die Proteinaggregation

30 µg frisch isolierte Mitochondrien wurden in 100 µl Resuspensionspuffer (500 mM Sucrose, 160 mM KAc, 40 mM HEPES/KOH, pH 7,6, 10 mM MgAc, 5 mM Glutamat, 5 mM Malat, 1 mM DTT) resuspendiert und wie zuvor beschrieben hitzestress (42 °C, 20 min). Nachdem die Aggregate isoliert wurden (125 000 xg, 40 min, 4 °C), wurden die Überstände (Üb 1) mit TCA gefällt und die Pellets in Resuspensionspuffer, welcher 0,2 M,

0,5 M oder 1 M KCl enthielt, resuspendiert. Lösliche Proteine (Üb 2) und unlösliche Proteine wurden erneut durch Zentrifugation voneinander getrennt und die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

4.2.17 Wiederherstellung der Löslichkeit aggregierter Proteine nach Hitzestress

Um zu überprüfen, ob hitzeinduzierte Aggregate nach einer Erholungsphase wieder in ihrer löslichen Form vorliegen, wurden 30 µg frisch isolierte Mitochondrien in 100 µl ATP-haltigem Puffer (250 mM Sucrose, 80 mM Kaliumacetat, 20 mM HEPES/KOH, pH 7,6, 5 mM Magnesiumacetat, 5 mM Glutamat, 5 mM KPi , pH 7,4, 2 mM ATP, 1 mM DTT) resuspendiert, um die Mitochondrien in einem energiereichen Zustand zu erhalten. Nach einem 20-minütigen Hitzestress bei 42 °C wurden die Mitochondrien bis zu 2 h bei 30 °C inkubiert (Erholungsphase). Anschließend wurden die Proben wie bereits beschrieben lysiert, zentrifugiert und analysiert.

4.2.18 Proteinase K Behandlung von Mitochondrien

Für die Untersuchung der mitochondrialen Integrität nach Hitzestress wurden isolierte Mitochondrien nach 20-minütigem Hitzestress bei 42 °C mit 1,25 µg/ml (f. c.) Proteinase K für 20 min bei 25 °C inkubiert. Der proteolytische Verdau durch Proteinase K wurde durch Zugabe von 1,5 mM PMSF und anschließender 15-minütiger Inkubation gestoppt. Die Proteine wurden abschließend mittels TCA-Fällung isoliert. Um einen erfolgreichen Verdau durch Proteinase K zu verifizieren, wurden parallel Mitochondrien in Lysispuffer (0,5 % (v/v) Triton X-100, 200 mM KCl, 30 mM Tris/HCl, pH 7,4, 0,5 mM PMSF, 1x Proteaseinhibitor) aufgeschlossen und wie oben beschrieben mit Proteinase K inkubiert. Zur Bestimmung der Proteinase K Resistenz der Aggregate nach Hitzestress, wurden die Mitochondrien wie beschrieben hitzestress und lysiert. Die lysierten Mitochondrien wurden mit 0,25 µg/ml oder 0,5 µg/ml Proteinase K für 5, 10 und 20 min inkubiert. Nach 15-minütiger Inkubation mit PMSF wurden die Proben mit TCA gefällt.

4.2.19 Messung des mitochondrialen Membranpotenzials isolierter Mitochondrien

Für die Messung des mitochondrialen Membranpotenzial ($\Delta\Psi$) isolierter Mitochondrien nach Hitzestress, wurden 30 µg Mitochondrien nach dem Hitzestress durch Zentrifugation reisoliert und in Potentialpuffer (600 mM Sorbitol, 20 mM KPi , pH 7,2, 10 mM MgCl_2 ,

10 mM Glutamat, 5 mM Malat, 0,1 % (w/v) BSA) resuspendiert. Die Proben wurden mit 1 μ M TMRE für 10 min bei 30 °C inkubiert. Parallel wurde eine Negativkontrolle ($-\Delta\Psi$) vor der TMRE-Färbung mit Valinomycin bei 30 °C behandelt. Alle Proben wurden mit Potentialpuffer gewaschen und die TMRE-Fluoreszenz (Extinktion: 540 nm, Emission: 585 nm) wurde in einem Mikroplattenlesegerät gemessen.

4.2.20 Bestimmung des ATP-Gehalts isolierter Mitochondrien

Der mitochondriale ATP-Gehalt wurde mittels eines Luciferase-basierten ATP Assay (ATP-Determination Kit, Invitrogen) gemäß den Herstellerinformationen bestimmt. 75 μ g frisch isolierte Mitochondrien wurden in Resuspensionspuffer gelöst und die ATP-Menge entweder direkt oder nach einer 20-minütigen Inkubation bei 25 °C oder 42 °C bestimmt. Die ATP-Menge wurde anhand einer ATP-Standardkurve (0-1 mM ATP) bestimmt.

4.2.21 Bestimmung von Enzymaktivitäten in isolierten Mitochondrien

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Malatdehydrogenase (MDH) und des α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes (OGDC) nach Hitzestress, wurden isolierte Mitochondrien (100 μ g/Probe für das MDH Aktivitätsassay und 200 μ g/Probe für das KGDHC Aktivitätsassay) in Resuspensionspuffer (30 μ g Mitochondrien/100 μ l Puffer) für 20 min bei Kontroll- (25 °C) und Hitzeschock-Bedingungen (42 °C) inkubiert. Nach der Reisolation der Mitochondrien durch Zentrifugation (12 000 xg, 10 min, 4 °C) wurden die Mitochondrien in Homogenisationspuffer (0,5 % Triton X-100, 50 mM Tris/HCl, pH 7,4) lysiert und bei maximaler Geschwindigkeit bei Raumtemperatur geschüttelt. Das jeweilige Reaktionsgemisch wurde bei 37 °C vorgewärmt und in eine Quartzküvette gegeben. Die lysierten Mitochondrien wurden zu dem Reaktionsgemisch hinzugegeben, sobald sich eine Basisabsorption bei 340 nm einstellte. Die Reaktionsgemische bestanden aus 50 mM Tris/HCl, pH 7,4, 0,5 mM Oxalacetat und 75 μ M Nicotinamidadeninindinukleotid (NADH) für das MDH-Aktivitätsassay sowie 50 mM Tris/HCl, pH 7,4, 50 mM KCl, 5 mM α -Ketoglutarat, 2 mM $MgCl_2$, 0,3 mM Thiaminpyrophosphat, 0,3 mM Coenzym A und 2 mM NAD^+ für das OGDC-Aktivitätsassay. Die Enzymaktivitäten wurden bei 340 nm alle 15 sec für 10 min in einem Photometer gemessen, entweder durch eine verminderte NADH-Absorption (MDH) oder eine gesteigerte NADH-Absorption (OGDC).

4.2.22 Zweidimensionale Differenz-Gelelektrophorese (2D-DIGE)

Für die Analyse des mitochondrialen Proteoms nach Hitzestress wurden für jede Probe 150 μ g isolierte Mitochondrien in Resuspensionspuffer gelöst und für 20 min bei 25 °C

(Kontrolle) oder 42 °C (Hitzestress) inkubiert, wie bereits beschrieben lysiert und durch Zentrifugation (125 000 xg, 40 min, 4 °C) lösliche (Überstand) von unlöslichen (Pellet) Proteinen getrennt. Die Überstände wurden mit TCA gefällt und in Isoelektrische Fokussierung (IEF)-Lysispuffer (7 M Urea, 2 M Thiourea, 4 % (w/v) CHAPS, 10 mM Dithiothreitol (DTT), 1x Proteaseinhibitor, 40 mM Tris/HCl, pH 8,8) resuspendiert und durch 10-minütiges Schütteln bei maximaler Geschwindigkeit und 4 °C lysiert.

In zwei voneinander unabhängigen Experimenten wurden jeweils Triplikate für die Kontroll- und die Hitzestressprobe erstellt. Die Kontroll-, Hitzestress- sowie eine Standardprobe, welche aus einem Mix aller Proben bestand, wurden mittels verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe (CyDye DIGE Flour Minimal Dyes, GE Healthcare) gemäß den Herstellerinformationen markiert und auf einem Gel gemeinsam analysiert. Die Kontrolle und die hitzestressierte Probe wurden abwechselnd mit dem grünen (Cy3) oder roten (Cy5) Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die Standardprobe wurde mit dem gelben (Cy2) Farbstoff markiert. Die Kontroll-, die Hitzestress- sowie die Standardprobe wurden vereint und Rehydratationspuffer (7 M Urea, 2 M Thiourea, 2 % (w/v) CHAPS, 20 mM DTT, 0,8 % Pharmalyte™ 3-11 NL, geringe Menge Bromophenolblau) bis zu einem Gesamtvolumen von 340 µl zugegeben. Die Proben wurden auf einen trockenen 18 cm nicht-linearen (pH 3-11) Immobilinestreifen (GE Healthcare) aufgetragen.

Parallel wurde die Gesamtproteinmenge aus 400 µg Mitochondrien mittels TCA gefällt, in 340 µl Rehydratationspuffer resuspendiert und wie oben beschrieben auf einen Immobilinestreifen aufgetragen. Diese Probe diente der Färbung mit Coomassie Brilliant Blau G-250 und der anschließenden Analyse via Massenspektrometrie.

Die isoelektrische Fokussierung erfolgte in einem IPGphor isoelektrischen Fokussiersystems (GE Healthcare), in welchem die Immobilinestreifen zunächst für 12 h bei 30 Volt (V) rehydriert wurden. Anschließend wurde schrittweise die Proteinfokussierung durchgeführt: jeweils 1 h bei 200 V, 500 V und 100 V, gefolgt von einem langsamen Anstieg (2,5 h) auf 8000 V für 3 h und abschließendem Abfall auf 500 V für 2,5 h. Die fokussierten Streifen wurden in Äquilibrationpuffer (6 M Urea, 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8, 50 % (v/v) Glycerol, 1 % (w/v) SDS), welcher zunächst mit 1 % (w/v) DTT zur Reduktion und anschließend 2,5 % Iodacetamid zur Alkylierung beinhaltete, inkubiert. Beide Inkubationsschritte wurden für 15 min im Dunkeln durchgeführt. Der Immobilinestreifen wurden auf ein 11 %-iges Gel ohne Sammelgel gegeben und mit Agarose überschichtet (0,5 % (w/v) Agarose in 1x SDS-Puffer). Die Proteine wurden gemäß ihrem Molekulargewicht für 1 h bei 0,5 Watt/Gel und anschließend bei 1,5 Watt/Gel über Nacht

bei 20 °C im Ettan™ DALTsix System (GE Healthcare) mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden gemäß der Wellenlänge der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe mit dem Fluoro Image Analyzer FLA-5100 (Fujifilm) detektiert und die Proteinspots durch die Delta2D Software (DECODON) analysiert. Für jedes Gel wurden die Spotintensitäten durch den Quotienten der Gesamtsumme der Spotintensitäten bei 42 °C durch die Gesamtsumme der Spotintensitäten bei 25 °C normalisiert. Es wurden sowohl der Mittelwert der Spotintensitäten der 6 verschiedenen Gelen als auch der Standardfehler des Mittelwerts (engl.: standard error of the mean, SEM) errechnet. Die Signifikanz wurde mit der GraphPad Prism 6 Software mittels einfaktorieller Varianzanalyse unter Verwendung des Dunnetts Tests berechnet. Ein p -Wert von $\leq 0,001$ wurde als signifikant definiert.

Volumen für 6 Gele (1 mm)	
	11 %
Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8) Mix [ml]	219,9
1,875 M Tris/HCl pH 8,8 [ml]	128,1
10 % [w/v] SDS [ml]	6
ddH ₂ O [ml]	241,2
Entgasen der Lösung unter Rühren mittels Vakuumpumpe.	
10 % [w/v] APS [ml]	3,3
TEMED [μ l]	240
Total [ml]	600

4.2.23 Peptidvorbereitung und MALDI-TOF

Die Proteinspots wurden manuell von einem Coomassie Brilliant Blau G-250 gefärbten 2D-Gel ausgeschnitten und anschließend mit Wasser, 50 % Acetonitril (ACN) und 100 % Acetonitril gewaschen und schrittweise entfärbt. Die Gelstücke wurden in einem Vakuum Konzentrator für 30 min bei 40 °C und 1000 xg getrocknet und anschließend mit 20 mM Dithiothreitol (DTT) in 50 mM Ammoniumbicarbonat für 30 min bei 55 °C reduziert sowie mit 40 mM Iodacetamid (IAA) in 50 mM Ammoniumbicarbonat für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln alkylert. Die Gelstücke wurden gewaschen, mit 100 % ACN dehydriert und im Vacuum Konzentrator getrocknet. Die Proteine wurden mit Trypsin (400 pg/Gelstück in 50 mM Ammoniumbicarbonat) bei 37 °C über Nacht verdaut. Die Peptidextrakte wurden abgenommen und das verbleibende Gelstück erneut mit 50 %

ACN extrahiert. Die Peptide wurden im Vakuum-Konzentrator getrocknet und bei -20 °C gelagert.

Für die MALDI-TOF (Matrix-Assistierte-Laser-Desorption-Ionisierung (MALDI)) mit Flugzeitanalyse (engl.: time of flight (TOF)) wurden die Peptide in 8 µl 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) gelöst. 1 µl wurde auf einer AnchorChip 384 Target Platte (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland) getrocknet. Das Matrixlösungsmittel (85 % Acetonitril, 0,1 % TFA, 1 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) wurde mit α -Cyano-4-hydroxymethylsäure bei Raumtemperatur gesättigt. Die Matrixlösung wurde 1:30 mit dem Matrixlösungsmittel verdünnt und 1 µl der verdünnten Matrixlösung auf die getrockneten Peptide gegeben.

Die MALDI-MS und MS/MS Messungen wurden mit einer automatischen Methode auf einem Bruker Autoflex III Spektrometer im positiven Reflektronmodus durchgeführt. 4000 MS1 Spektren wurden aufgezeichnet (700-3150 m/z), mittels der FlexAnalysis 3.3 Software prozessiert und zu ProteinScape 3.0 zur Auswertung gesendet. Passende Peptidionen wurden der MS/MS Analyse (LIFT-Prozess ohne Kollisionsgas) mit einer Erfassung von 1000 Spektren pro Vorläuferion zugeführt. Die Peptididentifikation wurde durch die hauseigene Mascot Server Version 2.4.1 (Matrix Science Ltd, UK) durch die Suche gegen menschliche Sequenzen in der SwissProt Datenbank durchgeführt. Die Oxidation von Methionin und Karbamidomethylierung von Cystein wurden als dynamische Modifikationen gesetzt. Peptididentifikationen, welche lediglich auf MS1 Daten (engl.: Peptide Mass Fingerprint) basierten, wurde manuell anhand der Anzahl der identifizierten Peptidsignale, der Vollständigkeit der Zuordnung und des Massenfehlers bewertet.

4.2.24 *In organello* Translation

Zur Überprüfung der mitochondrialen Translationseffizienz nach Hitzestress wurden 50 µg frisch isolierte Mitochondrien in Resuspensionspuffer resuspendiert und für verschiedene Zeitpunkte (0-20 min) bei 25 °C und 42 °C inkubiert. Für die Untersuchung der Regeneration der Translation nach Hitzestress wurden die Proben zusätzlich nach dem Hitzestress für 0-120 min bei 25 °C inkubiert.

Nach Reisolation der Mitochondrien (12 000 xg, 10 min, 4 °C) wurde das Mitochondrienpellet in Translationspuffer (645 mM Sorbitol, 160 mM KCl, 21,5 mM Tris/HCl, pH 7,4, 21,5 mM ADP, 13,5 mM MgSO_4 , 3,2 mg/ml BSA, 14 µM Aminosäure Mix ohne Methionin, 0,53 mM GTP, 180 mM Kreatinphosphat, 4 µg/ml Kreatinkinase, 1,2 mg/ml Alpha-Ketoglutarat) resuspendiert. Wenn angegeben, wurden die Proben mit

Cycloheximid (f. c. 100 µg/µl) oder Chloramphenicol (f. c. 100 µg/µl) behandelt, um die zytosolische und die mitochondriale Translation zu inhibieren. Nach einer 3-minütigen Vorinkubation aller Proben bei 30 °C und 300 rpm, wurden die neu-synthetisierten mitochondrialen Proteine durch die Zugabe von [³⁵S]-Methionin/Cystein (f. c. 22 µCi/µl) für 45 min markiert. Die Translationsreaktion wurde durch die Zugabe von MOPS/Methionin-Puffer (50 mM MOPS/KOH, pH 7,2, 10 mM Methionin) gestoppt und für 30 min bei 30 °C inkubiert. Die Mitochondrien wurden anschließend in Waschpuffer (0,6 M Sorbitol, 1 mM EDTA, 5 mM Methionin) gewaschen und mittels SDS-PAGE auf einem 15 %igen Polyacrylamidgel, welches 1,1 M Urea enthielt, analysiert. Die Detektion erfolgte über digitale Autoradiographie und die Translationsprodukte wurden mit Hilfe der MultiGauge Software (Fujifilm) quantifiziert.

4.2.25 *In vitro* Import von [³⁵S]-markierten Prä-Proteinen in isolierte Mitochondrien

Der *in vitro* Import wurde unter Verwendung der radioaktiv markierten Prä-Proteine SU9(70)-DHFR, Trap1 und Mdh2, welche durch *in vitro* Transkription und Translation in Hasen-Retikulozytenlysat in Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin/Cystein hergestellt wurden, durchgeführt. Für jede Importreaktion wurden 50 µg frisch isolierte Mitochondrien in 100 µl Importpuffer (250 mM Sucrose, 80 mM Kaliumacetat, 20 mM HEPES/KOH, pH 7,6, 5 mM Magnesiumacetat, 5 mM Glutamat, 5 mM Malat, 5 mM KPi, pH 7,4, 2 mM ATP, 1 mM DTT) resuspendiert und für 2 min bei 30 °C präinkubiert. Als Negativkontrolle wurde eine Importreaktion durchgeführt, bei welcher das Membranpotenzial ($\Delta\Psi$) durch AVO-Lösung (8 µM Antimycin, 0,5 µM Valinomycin, 20 µM Oligomycin) vor dem Import inhibiert wurde. Die Importreaktion wurde durch die Zugabe von Retikulozytenlysat, welches das jeweilige radioaktiv markierte Prä-Protein enthielt, gestartet und für 40 min bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 0,5 µM Valinomycin gestoppt. Wenn angegeben, wurden die Proben mit 50 µg/ml Proteinase K (PK) für 30 °C bei 4 °C inkubiert, um nicht-importiertes Protein zu entfernen. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und digitaler Autoradiographie analysiert. Der Hitzestress der Proben erfolgte entweder vor der Importreaktion, um die Importeffizienz zu überprüfen, oder nach der Importreaktion, um zu testen, ob frisch importierte Proteine anfällig für die hitzeinduzierte Aggregation sind. Der Hitzeschock wurde wie zuvor beschrieben in Resuspensionspuffer für 20 min bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt.

5 Ergebnisse

5.1 Generelle Effekte von Hitzestress

5.1.1 Einfluss von Hitzestress auf die Morphologie von Mitochondrien in intakten HeLa Zellen

Zur Analyse des Einflusses von Hitzestress auf die generelle Beschaffenheit der Zelle und insbesondere der Mitochondrien, wurde die Morphologie von HeLa Zellen nach einer zweistündigen Inkubation bei 45 °C im Vergleich zu der physiologischen Wachstumstemperatur von 37 °C mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt.

Die fluoreszenzmikroskopischen Analysen der mitochondrialen Matrixproteine Hsp60 (engl.: 60 kDa heat shock protein) und Tufm (engl.: mitochondrial elongation factor Tu) sowie der Innenmembranproteine F1 β (engl.: ATP synthase subunit beta) und Sdha (engl.: flavoprotein subunit of the succinate dehydrogenase) zeigten, dass unter den Kontrollbedingungen das Netzwerk der Mitochondrien eine typische filamentöse Struktur aufwies, welche sich in die Peripherie der Zelle erstreckte. Unter dem Einfluss von Hitzestress hingegen zeigten die Mitochondrien eine kondensierte Morphologie, welche sich am Zellkern lokalisierte (Abb. 3).

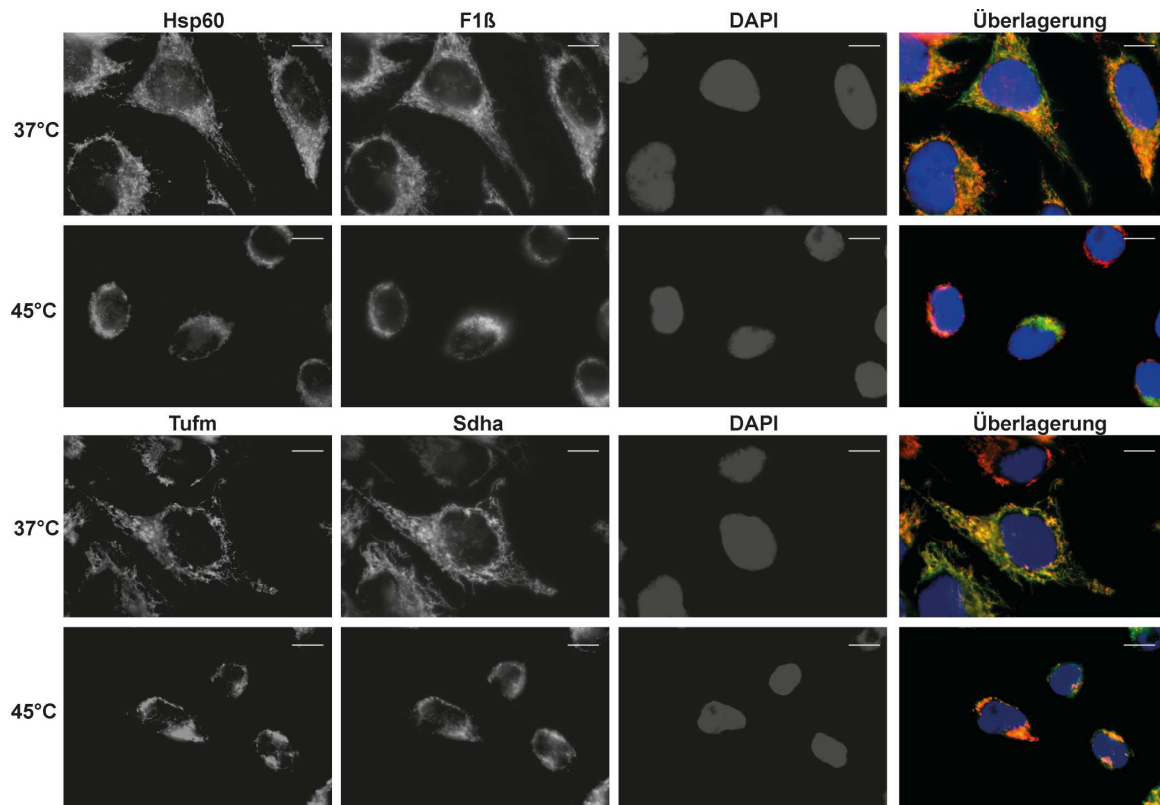


Abbildung 3: Fluoreszenzmikroskopische Analyse mitochondrialer Proteine in HeLa Zellen nach Hitzestress. Untersuchung der Zellen nach zweistündiger Inkubation bei den angegebenen Temperaturen mittels Fluoreszenzmikroskopie. Die mitochondrialen Proteine wurden mit fluoreszenz-markierten sekundären Antikörpern detektiert. Maßstabballen: 10 μm .

5.1.2 Einfluss von Hitzestress auf das Membranpotenzial und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in Mitochondrien intakter HeLa Zellen

Um den Einfluss von Hitzestress auf die funktionelle Integrität von Mitochondrien zu untersuchen, wurde das mitochondriale Membranpotenzial ($\Delta\psi$), welches sowohl für den Import zytosolischer Proteine als auch für die ATP-Bildung durch die Elektronentransportkette vonnöten ist, mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen. Hierfür wurden intakte HeLa Zellen für 2,5 h bei 37 °C (Kontrolle) sowie 45 °C (Hitzestress) inkubiert und mit dem Farbstoff Tetramethylrhodaminmethylester (TMRE) behandelt, welcher Mitochondrien mit intaktem Membranpotenzial spezifisch anfärbt. Als Kontrolle für Mitochondrien ohne Membranpotenzial wurden Zellen vor der TMRE-Färbung mit 0,1 μM Valinomycin behandelt. Die Analyse mittels Durchflusszytometrie zeigte ein verringertes mitochondriales Membranpotenzial von ca. 30 % nach Hitzestress im Vergleich zur Kontrollbedingung (Abb. 4).

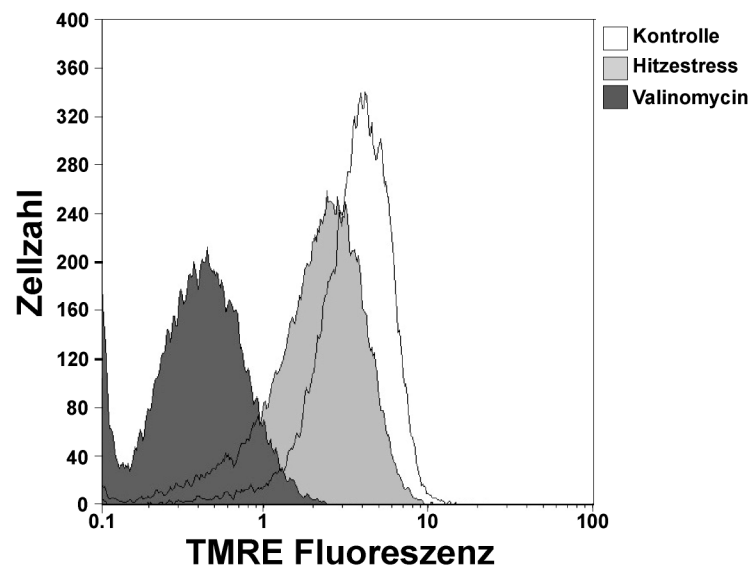


Abbildung 4: Messung des mitochondrialen Membranpotenzials in intakten HeLa Zellen. Messung des Membranpotenzials hitzestresser HeLa Zellen nach 2,5 h bei 45 °C im Vergleich zu ungestressten Zellen. $\Delta\psi$ wurde mittels TMRE-Färbung und Durchflusszytometrie analysiert. Weiß: Kontrolle bei 37 °C. Hellgrau: Hitzestress bei 45 °C. Dunkelgrau: Negativkontrolle (Valinomycinbehandlung). Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Als weiteren Indikator für das Stressniveau der Mitochondrien bei Hitzestress wurde zudem die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies mittels des Mitochondrien-spezifischen Farbstoffs MitoSOXTM, welcher Superoxidradikale detektiert, ermittelt. Für diesen Ansatz wurden HeLa Zellen wie oben beschrieben inkubiert. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit 100 μ M Menadion behandelt. Die Analyse mittels Durchflusszytometrie zeigte eine um 30-40 % erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies nach Hitzeschock (Abb. 5).

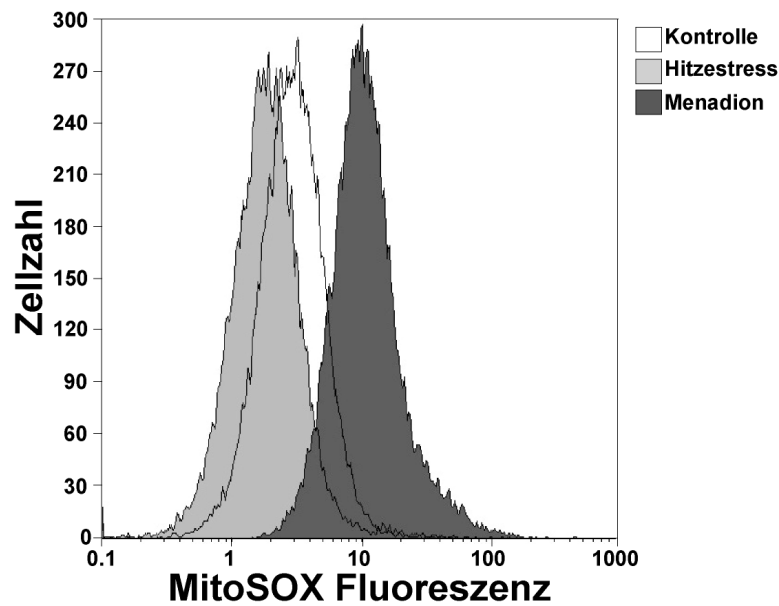


Abbildung 5: Messung der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in intakten HeLa Zellen. Zellen wurden, wie beschrieben, behandelt und die Bildung von Superoxidradikalen mittels MitoSOXTM-Färbung und Durchflusszytometrie analysiert. Weiß: Kontrolle bei 37 °C. Hellgrau: Hitzestress bei 45 °C. Dunkelgrau: Positivkontrolle (Menadionbehandlung). Die Ergebnisse repräsentieren drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

5.1.3 Einfluss von Hitzestress auf das Membranpotenzial isolierter Mitochondrien

Nachdem bereits der Einfluss von Hitzestress auf das mitochondriale Membranpotenzial intakter HeLa Zellen beobachtet werden konnte (Abb. 4), wurde weiterführend die Temperaturabhängigkeit des Membranpotenzials in isolierten Mitochondrien untersucht. Hierfür wurden frisch isolierte Mitochondrien aus HeLa Zellen 20 min bei verschiedenen Temperaturen inkubiert und anschließend mittels TMRE gefärbt. Die Fluoreszenz wurde in einem Mikroplattenlese-Gerät gemessen. Vergleichbar mit den Versuchen in intakten Zellen zeigten isolierte Mitochondrien ein ebenso vermindertes Membranpotenzial nach der Inkubation bei erhöhter Temperatur (Abb. 6). Im Gegensatz zu den Ergebnissen in intakten Zellen wiesen isolierte Mitochondrien jedoch bereits nach einer Inkubation bei 37 °C eine Verringerung des Membranpotenzials um ca. 20 % auf. Dies lässt auf eine erhöhte Sensitivität isolierter Mitochondrien gegenüber höheren Temperaturen im Vergleich zu intakten Zellen schließen, bei welchen 37 °C der physiologischen Wachstumstemperatur entsprechen. In folgenden Experimenten wurden daher die

Kontrollversuche für isolierte Mitochondrien bei 25 °C und nicht wie bei intakten Zellen bei 37 °C durchgeführt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass nach einem Hitzeschock isolierter Mitochondrien bei 42 °C das Membranpotenzial um ca. 70 % bzw. um 90 % bei einem schweren Hitzeschock bei 45 °C verringert wurde. Diese Ergebnisse lassen auf eine eindeutige Temperaturabhängigkeit des Membranpotenzials in isolierten Mitochondrien schließen.

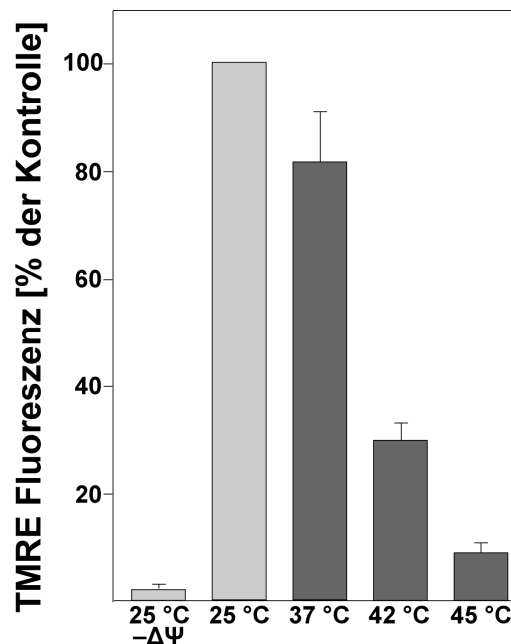


Abbildung 6: Messung des mitochondrialen Membranpotenzials in isolierten Mitochondrien. Frisch isolierte Mitochondrien aus HeLa Zellen wurden 20 min bei verschiedenen Temperaturen inkubiert und das mitochondriale Membranpotenzial ($\Delta\psi$) mittels TMRE-Färbung detektiert. Die TMRE Fluoreszenz wurde in einem Mikroplattenlese-Gerät gemessen. Als Kontrolle für Mitochondrien ohne Membranpotenzial ($-\Delta\psi$) wurden diese vor der TMRE-Färbung mit Valinomycin behandelt. Die Fehlerbalken stellen den Mittelwert und dessen Standardabweichung dar ($n = 3$).

5.1.4 ATP-Gehalt in Mitochondrien nach Hitzestress

Der Einfluss von Hitzestress auf das Energieniveau innerhalb der Mitochondrien wurde anhand der Analyse der ATP-Konzentration isolierter Mitochondrien vor und nach der 20-minütigen Inkubation bei 25 °C (Kontrolle) sowie 42 °C (Hitzestress) untersucht. Zur quantitativen Bestimmung von ATP wurde ein Biolumineszenz-Assay verwendet, welcher auf der ATP-abhängigen Umsetzung des Substrats D-Luciferin durch die rekombinante Glühwürmchen-Luciferase basiert, verwendet und die Lumineszenz im

Mikroplattenlesegerät gemessen. Unter Kontrollbedingungen zeigte sich eine Verringerung des ATP-Gehalts von etwa 25 %, wohingegen der ATP-Gehalt in hitzestressen Mitochondrien eine deutliche Verringerung von etwa 80 % aufwies (Abb. 7).

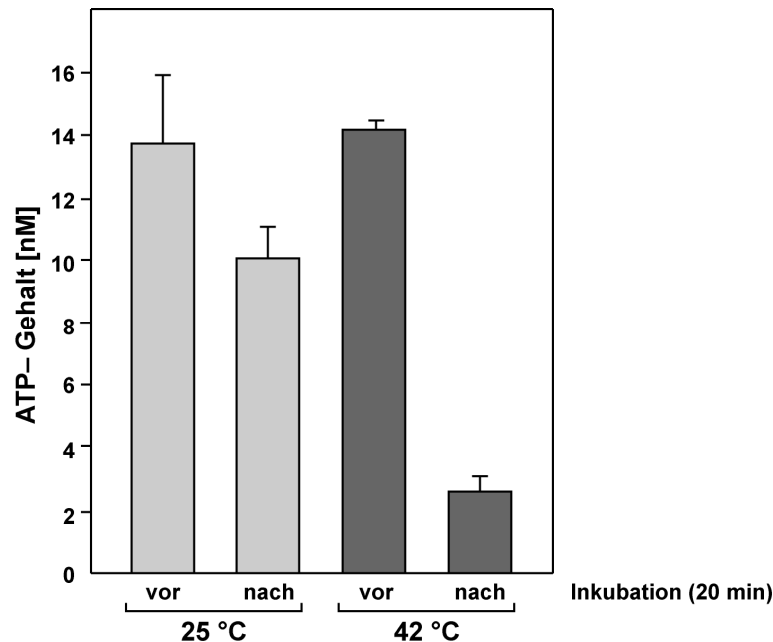


Abbildung 7: Messung des ATP-Gehalts in isolierten Mitochondrien. Bestimmung des ATP-Gehalts in isolierten HeLa Mitochondrien mittels eines Luciferase-basierten Biolumineszenz-Assays sowohl vor als auch nach einer 20-minütigen Inkubation bei Kontroll- und Hitzeschockbedingungen. Die Fehlerbalken stellen den Mittelwert sowie dessen Standardabweichung dar ($n = 2$).

5.1.5 Mitochondriale Integrität nach Hitzestress

Um zu untersuchen, ob die mitochondrialen Membranen nach Hitzestress noch intakt sind, wurden frisch isolierte Mitochondrien aus HeLa Zellen nach einer 20-minütigen Inkubation bei 42 °C sowie bei Kontrollbedingung mit Proteinase K (PK) behandelt. Diese ist in der Lage Proteine zu verdauen, die nicht durch eine intakte mitochondriale Innenmembran geschützt sind. Der Vergleich gestresster und ungestresster Mitochondrien zeigte, dass mitochondriale Matrixproteine wie Trap1 (engl.: TNF-receptor associated protein 1), Mpp (engl.: mitochondrial-processing peptidase) und Tufm auch nach Hitzestress nicht durch PK verdaut wurden (Abb. 8). Die Translokase der Innenmembran Tim23 hingegen wies nach der Inkubation bei 42 °C zum Teil einen Verdau durch PK auf. Dies könnte Rückschlüsse auf eine intakte innere Membran geben, wohingegen die äußere

Mitochondrienmembran nach Hitzeschock beschädigt sein könnte, was den teilweise Verdau von Tim23 erklären könnte. Um zu verifizieren, dass die eingesetzte Menge an PK für einen vollständigen Proteinverdau ausreichend war, wurden in einem Parallelexperiment Mitochondrien vor der PK-Behandlung lysiert. Es zeigte sich, dass die getesteten Proteine bei der verwendeten PK-Konzentration verdaut werden konnten, mit Ausnahme von Mpp, welches lediglich teilweise verdaut wurde.

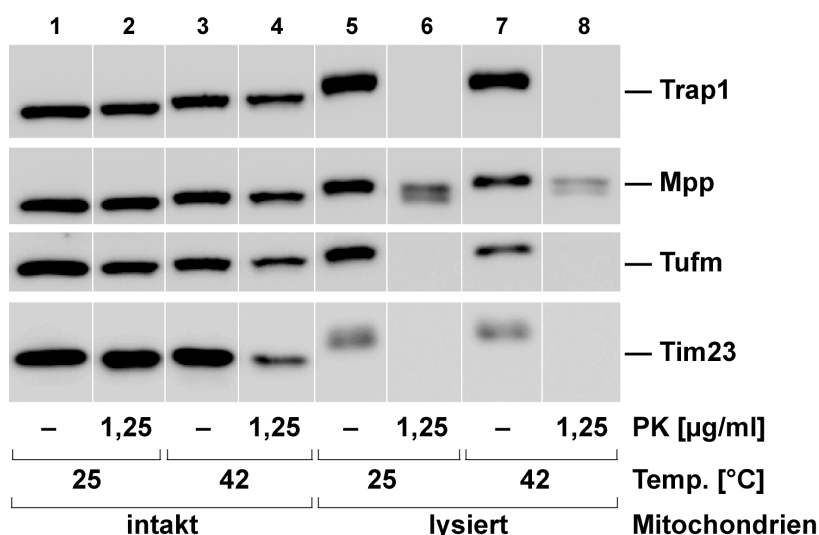


Abbildung 8: Integrität isolierter Mitochondrien nach Hitzestress. 20 min Inkubation isolierter Mitochondrien bei den angegebenen Temperaturen und darauf folgende 20 min Behandlung mit und ohne Proteinase K (PK). Als Kontrolle für einen erfolgreichen Verdau der Proteine wurden parallel Mitochondrien vor der PK-Behandlung mit 0,5 % Triton X-100 lysiert.

5.1.6 Einfluss von Hitzestress auf die mitochondrialen Atmungskettenkomplexe

Zur weiteren Analyse der mitochondrialen Funktionalität wurde eine Untersuchung der Struktur der Atmungskettenkomplexe nach Hitzestress durchgeführt, da eine der Hauptfunktionen der Mitochondrien die ATP-Produktion durch den Elektronentransport über die mitochondriale Membran durch die Komplexe I-V darstellt (Friedman & Nunnari, 2014). Hierfür wurden die Komplexe unter nativen Bedingungen mit Hilfe der Blauen Nativ-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Blue native PAGE) aufgetrennt und anschließend mittels Western Blot analysiert. Dabei wurden Antikörper verwendet, welche spezifisch an Untereinheiten der fünf Atmungskettenkomplexe binden. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Zusammensetzung der Komplexe nach Hitzestress

im Vergleich zu den Kontrollbedingungen gezeigt werden (Abb. 9). Es wurden lediglich kleine Veränderungen in den Komplexen II und IV, bei welchen die detektierte Menge der jeweiligen Untereinheit nach Hitzestress im Vergleich zur Kontrollbedingung reduziert vorlag, festgestellt werden. Diese Beobachtungen waren jedoch nicht reproduzierbar und sind somit auf experimentelle Schwankungen zurückzuführen.

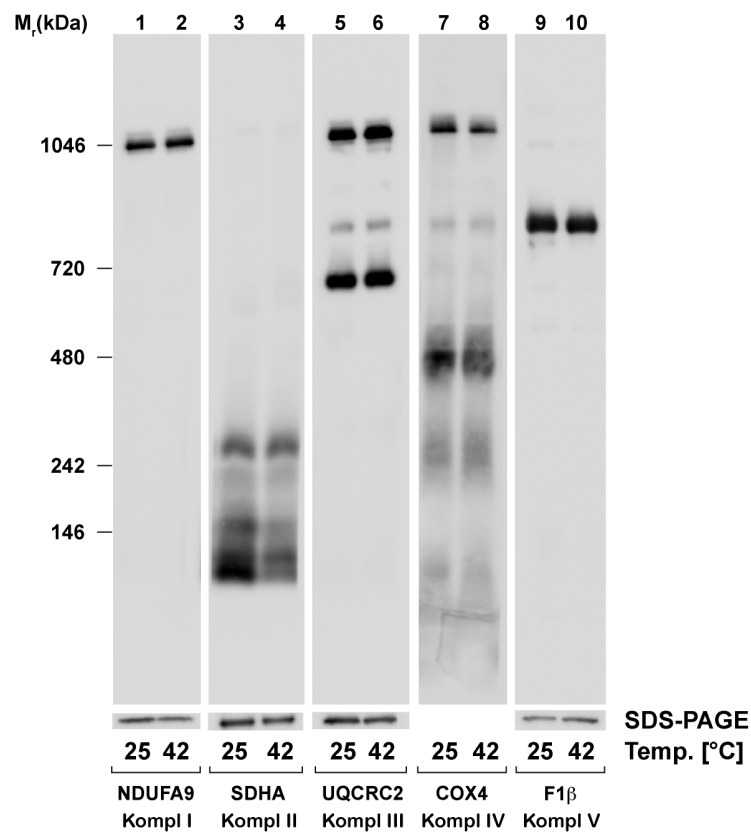


Abbildung 9: Analyse der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe nach Hitzestress. Isolierte Mitochondrien aus HeLa Zellen wurden nach 20-minütiger Inkubation bei 25 °C und 42 °C mittels nativer Gelelektrophorese (BN-PAGE) oder Standard SDS-PAGE als Kontrolle aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Der dargestellte Western Blot ist repräsentativ für zwei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente. Die Immunodetektion für Komplex IV nach SDS-PAGE war aufgrund eines nicht wirksamen Antikörpers nicht erfolgreich. Das Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Dr. C. Rüb durchgeführt.

5.1.7 Einfluss von Hitzestress auf die enzymatische Aktivität mitochondrialer Enzyme

Zur Vervollständigung der Analyse des Hitzestresseinflusses auf die Mitochondrien, wurde die Aktivität mitochondrialer Schlüsselenzyme nach der Inkubation bei erhöhter Temperatur untersucht. Als repräsentative Enzyme des Zitratzyklus wurden die enzymatische Aktivität der Malatdehydrogenase (MDH) und des α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes (OGDC) nach 20-minütigem Hitzeschock im Vergleich zu der Kontrollbedingung getestet. Wie in Abbildung 10 dargestellt war keine Veränderung in der MDH-Aktivität nach Hitzeschock zu beobachten, während die OGDC-Aktivität auf ca. 65 % im Vergleich zu der Kontrollbedingung reduziert war. Die temperaturabhängige Inaktivierung des OGDC lässt auf eine deutliche Beeinträchtigung der mitochondrialen Enzymaktivität als Konsequenz von Hitzestress schließen.

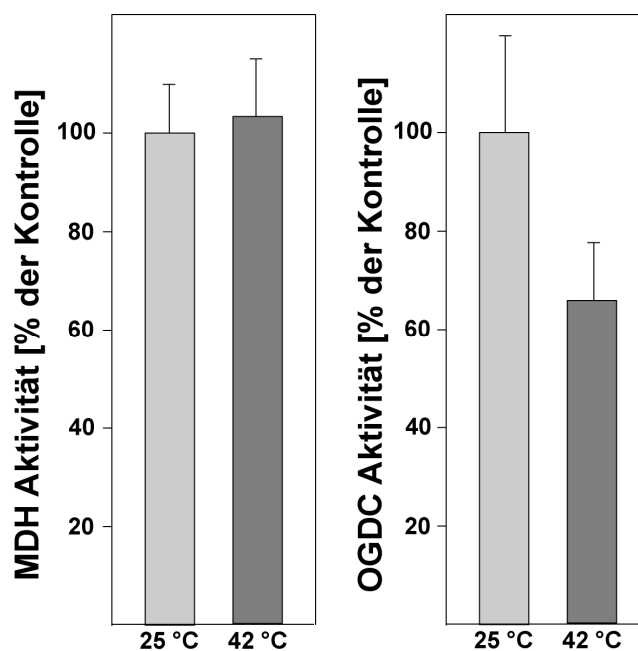


Abbildung 10: Aktivität von Enzymen des Zitratzyklus nach Hitzeschock. Frisch isolierte Mitochondrien aus HeLa Zellen wurden 20 min bei 42 °C hitzegeschockt (Kontrolle: 25 °C) und anschließend die Enzymaktivität der Malatdehydrogenase (MDH) sowie des α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes (OGDC) im Photometer bestimmt. Die dargestellten Werte entsprechen der Enzymaktivität nach Hitzestress im Vergleich zu den Kontrollbedingungen. Dargestellt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung (n = 3).

5.2 Analyse des mitochondrialen Proteoms nach Hitzeschock

Neben der Untersuchung der generellen Effekte von Hitzestress auf Mitochondrien stand die Analyse der Auswirkungen erhöhter Temperaturen auf Proteinebene im Fokus der Arbeit. Um die Auswirkungen von Proteinaggregationen auf die funktionelle Integrität der Mitochondrien zu untersuchen, wurden zunächst Proteine identifiziert, die unter Hitzeschockbedingungen zur Aggregation neigten.

Dies wurde unter *in vivo* ähnlichen Bedingungen getestet, indem Mitochondrien aus HeLa Zellen isoliert und für 20 min bei 25 °C (Kontrolle) sowie 42 °C (Hitzeschock) inkubiert wurden. Nach der Lyse der Mitochondrien wurden sedimentierte, aggregierte Proteine (Pellet) von löslichen Proteinen (Überstand) durch Ultrazentrifugation bei 125 000 xg getrennt. Da unter Kontrollbedingungen kaum Proteine sedimentierten, wurden im Folgenden der Anteil löslicher Polypeptide in den Überständen der Proben analysiert, um die verschiedenen Proben besser miteinander vergleichen zu können. Um Veränderungen im mitochondrialen Proteom nach Hitzestress im Vergleich zu der Kontrollbedingung quantitativ zu bestimmen, wurden die Proben mittels zweidimensionaler Differenz-Gelelektrophorese (2D-DIGE), welche die parallele Auftrennung von drei verschiedenen Proben auf einem Gel ermöglicht, analysiert. Hierfür wurde das lösliche Proteom von gestressten und ungestressten Mitochondrien sowie ein Standard, welcher aus einem Gemisch aller Proben bestand, mit drei unterschiedlichen Fluorophoren markiert und die Proteine anschließend mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese gemäß ihres isoelektrischen Punktes sowie ihrer Größe aufgetrennt. Die Proteinspots wurden mit Hilfe der spezifischen Wellenlänge für den jeweiligen Fluorophor detektiert und die Spotintensitäten mittels der Delta2D Software (DECODON) bestimmt. Die Daten von zwei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils aus Triplikaten für gestresste und ungestresste Mitochondrien bestanden, wurden ausgewertet. Die Identifikation der Proteinspots erfolgte durch manuelles Ausschneiden aus Coomassie gefärbten Gelen, auf welchen die Gesamtproteinmenge isolierter HeLa Mitochondrien aufgetrennt wurden. Die ausgeschnittenen Proteine wurden mit Trypsin verdaut und mittels Massenspektrometrie analysiert. Um ein vergleichbares Proteinmuster zu erhalten, wurde in dieser Arbeit die lösliche Proteinfraction (Überstand) der Proben analysiert. Eine reduzierte Proteinspot-Intensität hitzestresser Mitochondrien im Vergleich zu der Kontrollprobe, konnte somit als Protein, welches unter dem Einfluss von Hitzestress aggregiert und dadurch weniger löslich ist, interpretiert werden. Dass eine Degradation der Proteine die Ursache für die

verringerte Proteinmenge im Überstand darstellt, ist aufgrund der kurzen Inkubationszeit von 20 min nicht wahrscheinlich.

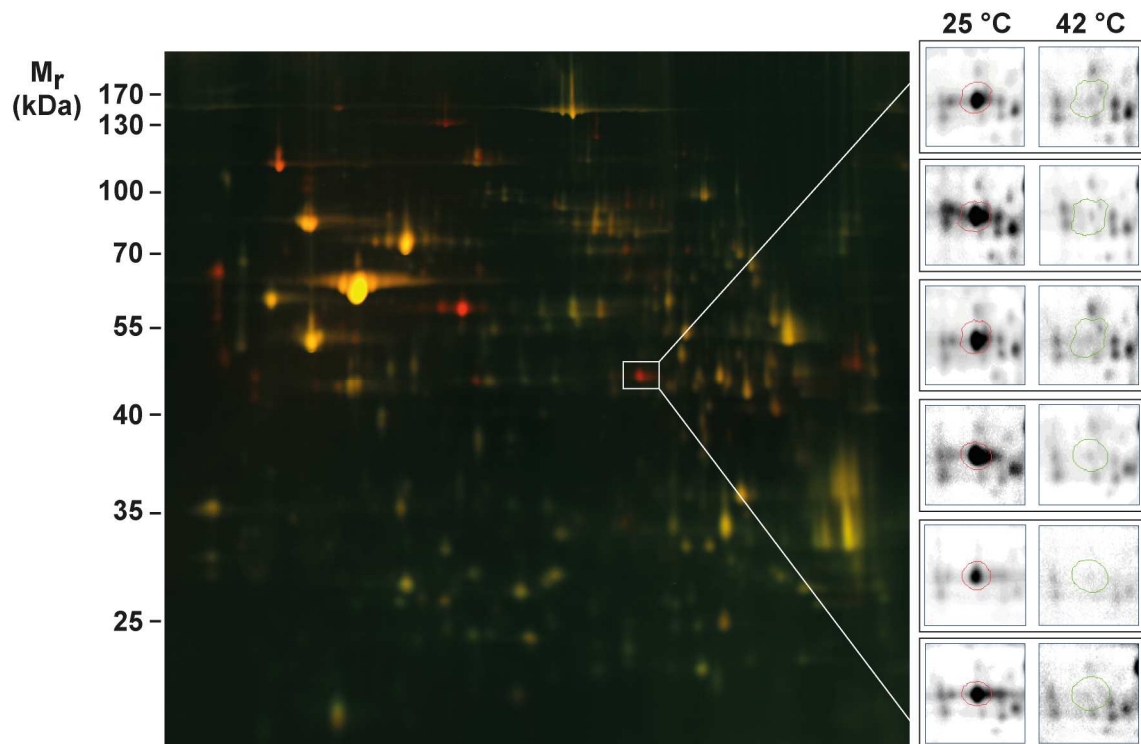


Abbildung 11: Zweidimensionale Differenz-Gelelektrophorese mitochondrialer Proteine. Isolierte Mitochondrien aus HeLa Zellen wurden 20 min bei 25 °C oder 42 °C inkubiert, lysiert und anschließend mittels Ultrazentrifugation in eine lösliche Proteinfraction sowie eine unlöslichen Fraction getrennt. Das lösliche Proteom der jeweiligen Probe sowie eines Standards wurde mittels verschiedener Fluoreszenzfarbstoffen markiert und auf einem Gel durch zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt. Das dargestellte Gel ist repräsentativ für sechs verschiedene Gele, welche analysiert wurden. Rot: lösliches Proteom der Kontrollprobe. Grün: lösliches Proteom nach Hitzeschock. Gelb: überlagerte Proteinspots. Rechts: Vergrößerte Darstellung der Proteinspots des mitochondrialen Elongationsfaktors Tu (Tufm) bei 25 °C sowie 42 °C für die sechs verschiedenen Gele. M_r : relative Molekülmasse.

Die Analyse der Proteinmenge im löslichen Teil des mitochondrialen Proteoms nach Hitzeschock zeigte im Vergleich zu der Kontrollbedingung keine große Veränderung (Abb. 11). Proteine des löslichen Proteoms der hitzestressierten Probe sind hier in grün, die der Kontrollprobe in rot dargestellt. Gelbe Proteinspots repräsentieren Proteine, deren Menge sich nach Hitzeschock nicht veränderte. Die Abwesenheit von Proteinen im löslichen Proteom der Hitzeschockprobe im Vergleich zur Kontrollprobe deutet auf eine hitzeinduzierte Aggregation dieser hin. Es konnten 10 Proteinspots ausgemacht werden, welche konsistent in allen Experimenten im löslichen Proteom nach Hitzeschock

abwesend waren. Jedoch konnten lediglich 4 Proteine mittels Massenspektrometrie identifiziert werden, wobei es sich bei zwei der Proteine, Pdia3 (engl.: protein disulfide-isomerase A3) sowie Hyou1 (engl.: hypoxia up-regulated protein 1), gemäß der Datenbank um Proteine des Endoplasmatischen Retikulum (ER) handelte. Die Kontamination mit ER-Proteinen kann durch die experimentelle Prozedur bei der Isolation der Mitochondrien aus HeLa Zellen zurückgeführt werden, bei welcher die Mitochondrien- und die ER-Fraktion mittels differentieller Zentrifugation nicht vollständig voneinander getrennt werden können. Bei den übrigen beiden identifizierten Proteinen handelte es sich jedoch um mitochondriale Proteine. Die mitochondriale Lon Peptidase 1 (LonP1) wies eine teilweise Aggregation auf. Den prominentesten Proteinspot jedoch, welcher nach Hitzeschock vollständig aggregierte, stellte der mitochondriale Elongationsfaktor Tu (Tufm) dar. Dieses Ergebnis war in allen sechs Gelen reproduzierbar, wie in Abbildung 11 rechts dargestellt.

Des Weiteren wurden die Ergebnisse von 17 weiteren Proteinen, welche mittels Massenspektrometrie identifiziert werden konnten, jedoch keine signifikante Veränderung in ihrer Löslichkeit zeigten (Abb. 12), analysiert (Abb. 13, Tab. 1).

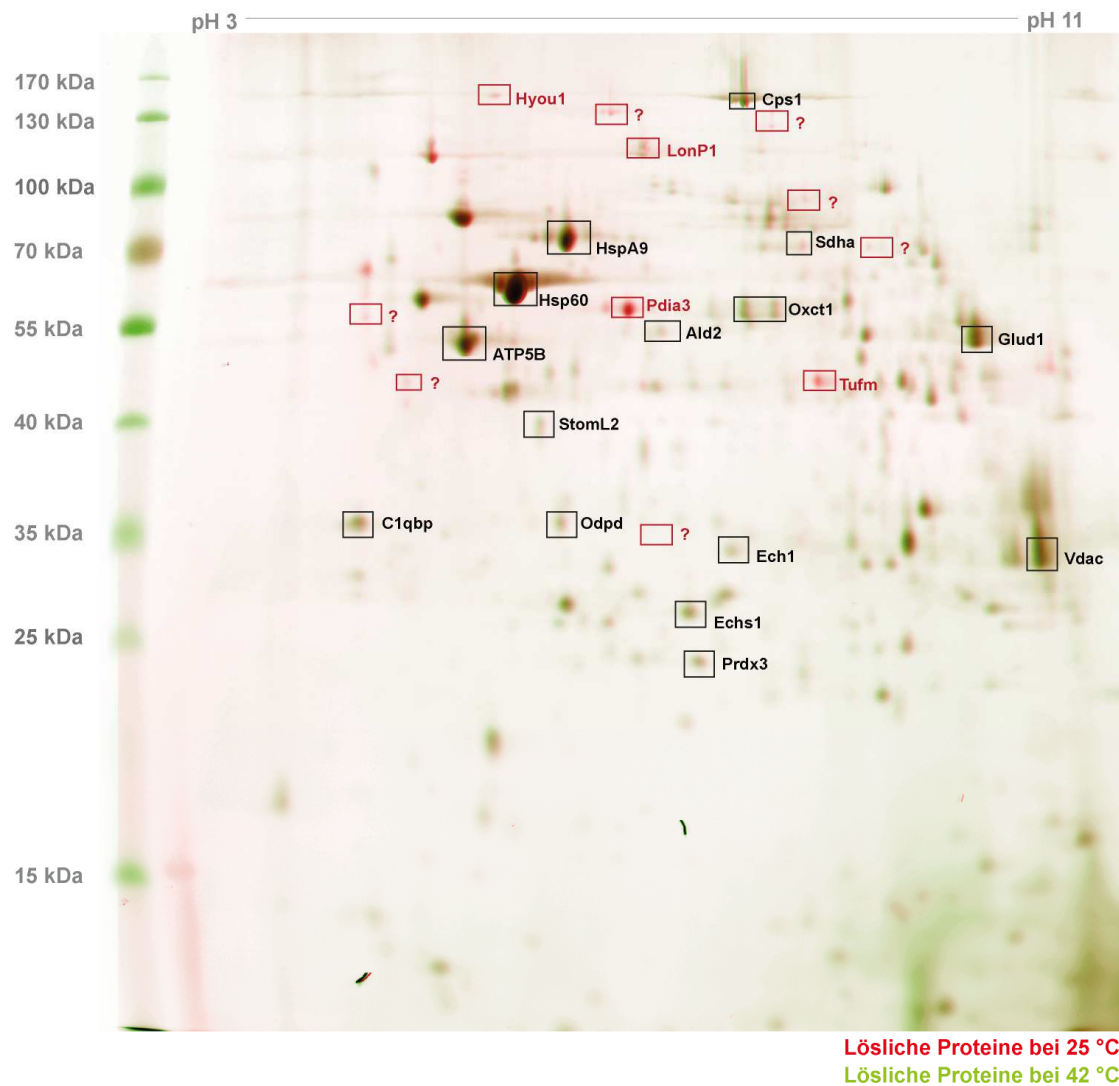


Abbildung 12: Identifizierte mitochondriale Proteine mittels Differenz-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie. Das Gel entspricht dem Gel aus Abbildung 11. Rot: lösliches Proteom der Kontrollprobe. Grün: Lösliches Proteom nach Hitzeschock. Die Proteine, welche nach Hitzeschock eine geringere Menge an löslichem Protein aufwiesen, wurden rot markiert. Nicht identifizierte Proteine sind mit einem Fragezeichen gekennzeichnet. Proteine, welche mittels Massenspektrometrie identifiziert wurden, wurden mit ihrem Gennamen beschriftet. Für eine genauere Beschreibung der Proteine siehe Tabelle 1.

Tabelle 1. Änderung der Menge löslichen Proteins nach Hitzeschock

Nr.	Protein	Beschreibung	UniProt Eintrag	Größe [kDa]	pI	Lösliches Protein [%]
1	Aldh2	Aldehyde dehydrogenase	P05091	54,34	5,76	103 ± 4
2	Atp5B	ATP synthase subunit beta	P06576	51,69	4,74	115 ± 2
3	C1qbp	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein	Q07021	23,74	4,06	108 ± 3
4	Cps1	Carbamoyl-phosphate synthetase 1	A0A024 R454	160,35	6,32	113 ± 4
5	Sdha	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit	P31040	67,99	6,69	79 ± 9
6	Ech1	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase	Q13011	32,15	6,36	139 ± 20
7	Echs1	Enoyl-CoA hydratase	P30084	28,29	5,91	125 ± 5
8	Glud1	Glutamate dehydrogenase 1	P00367	55,93	7,21	125 ± 5
9	Hsp60	60 kDa heat shock protein	P10809	57,88	4,96	83 ± 4
10	HspA9	Stress-70 protein	P38646	68,66	5,23	93 ± 4
11	LonP1	Lon protease homolog	P36776	99,23	5,7	54 ± 3
12	Pdhb	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	P11177	35,85	5,23	108 ± 6
13	Prdx3	Thioredoxin-dependent peroxide reductase	P30048	21,5	6,14	104 ± 6
14	Oxct1	Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1	P55809	52,01	6,33	116 ± 5
15	StomL2	Stomatin-like protein 2	Q9UJZ1	35,63	5,13	121 ± 6
16	Tufm	Elongation factor Tu	P49411	44,97	6,75	28 ± 3
17	Vdac1	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	P21796	30,8	9,2	114 ± 7

Die relative Proteinmenge löslichen Proteins im Überstand nach Hitzeschock im Vergleich zur Kontrolle wurde wie in Abbildung 13 beschrieben, berechnet. Die Identität der Proteinspots wurde mittels Massenspektrometrie bestimmt. Die Beschreibung der Proteine erfolgte gemäß der Datenbank (www.uniprot.org). Das Molekulargewicht und der isoelektrische Punkt (pI) wurden durch die Subtraktion des Transitpeptids von der Gesamtpolypeptidkette mittels des SerialCloner 2-6 berechnet. Ausnahme ist hier Vdac1, welches als mitochondriales Außenmembranprotein kein Transitpeptid besitzt.

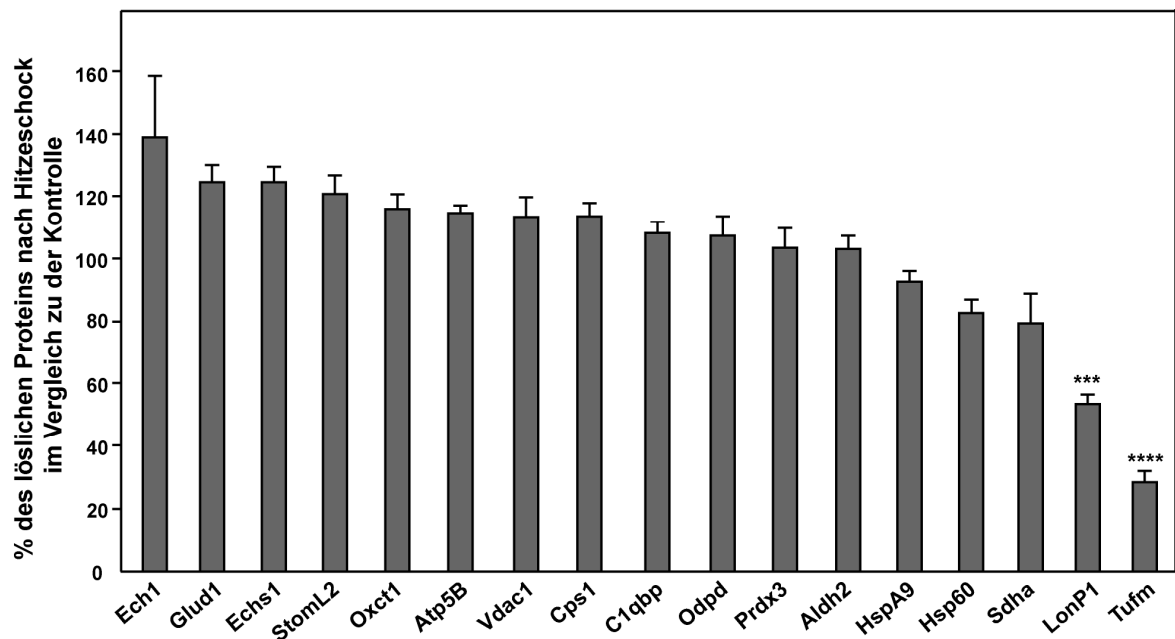


Abbildung 13: Quantitative Analyse löslicher Proteine nach Hitzeschock im Vergleich zur Kontrollprobe. Die Detektion sowie die Werte für die Intensität der Proteinspots wurden basierend auf Analysen der Delta2D Software (DECODON) ermittelt. Für jedes Gel wurden die Spotintensitäten mit dem Quotienten der Summe aller Spotintensitäten bei 42 °C versus 25 °C normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie deren Standardabweichung (n = 6). Die Signifikanz wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse unter Verwendung des Dunnetts Tests berechnet. Ein p -Wert ≤ 0.001 wurde als signifikant definiert und mit Sternen gekennzeichnet.

Die quantitative Analyse des löslichen Proteinanteils nach Hitzeschock ergab keine signifikante Verringerung für den Großteil der untersuchten Proteine (Abb. 13, Tab. 1). Im Gegensatz dazu reduzierte sich der lösliche Anteil von LonP1 um ca. 40 % bzw. der von Tufm um ungefähr 70 % nach Hitzeschock im Vergleich zur Kontrolle. Die Proteinmengen für Sdha, Hsp60 sowie HspA9 (engl.: stress-70 protein) zeigten lediglich eine Reduktion von 5-15 %.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse der mitochondrialen Proteomanalyse, dass die Proteine der Mitochondrien relativ resistent gegenüber Hitzestress waren, da der Großteil der Proteine auch bei erhöhten Temperaturen nicht zur Aggregation neigte. Umso bemerkenswerter ist daher, dass der mitochondriale Elongationsfaktor Tu eine sehr hohe Thermolabilität aufwies und fast vollständig unter dem Einfluss von Hitzestress aggregierte.

5.3 Aggregationsverhalten der mitochondrialen Elongationsfaktoren

Nachdem der mitochondriale Elongationsfaktor Tu (Tufm) als das Protein mit dem stärksten Aggregationsverhalten in Mitochondrien nach Hitzestress identifiziert werden konnte, stand die Untersuchung des Aggregationsverhaltens dieses Proteins sowie die Relevanz der Aggregation für die Funktionalität der Mitochondrien im Fokus dieser Arbeit. Zusätzlich zu Tufm wurde das Aggregationsverhalten des mitochondrialen Elongationsfaktors Tsfm, welcher im Translationsprozess mit Tufm assoziiert vorliegt, untersucht.

5.3.1 Temperaturabhängige Aggregation

Um nähere Aussagen über die Abhängigkeit der Aggregation von der Temperatur treffen zu können, wurden isolierte Mitochondrien zunächst für 20 min unter dem Einfluss von mildem und starkem Hitzeschock (37 °C, 42 °C und 45 °C) sowie der Kontrolltemperatur (25 °C) inkubiert. Diese Bedingungen wurden in den folgenden Versuchen als Standard verwendet. Obwohl 37 °C die physiologische Wachstumstemperatur von HeLa Zellen darstellt, wurde in dieser Arbeit 37 °C bei isolierten Mitochondrien bereits als milde Hitzeschockbedingung angesehen, da diese eine erhöhte Thermosensitivität aufwiesen als intakte Zellen (siehe 5.1.3).

Nach der Inkubation wurden die Mitochondrien lysiert und mittels Zentrifugation in eine lösliche (Überstand) und eine unlösliche (Pellet) Proteinfraction getrennt. Diese wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Zusätzlich zu den Elongationsfaktoren wurde das Aggregationsverhalten des mitochondrialen Ribosomproteins Mrpl38 untersucht. Es zeigte sich, dass Tufm und Tsfm sowie Mrpl38 bereits stark bei 37 °C aggregierten, und sich diese Tendenz mit steigender Temperatur verstärkte (Abb. 14). Bei einer Inkubation bei 42 °C war bereits kein lösliches Protein von Tufm und Mrpl38 im Überstand zu detektieren. Die mitochondrialen Matrixproteine Aconitase, Aco2, und Hsp60 aggregierten ebenfalls bei 37 °C, allerdings weniger stark als die zuvor Genannten. Während für Aco2 nach einem starken Hitzeschock bei 45 °C eine komplette Aggregation zu beobachten war, war Hsp60 noch teilweise löslich. Als Kontrollprotein wurde die Translokase der inneren Mitochondrienmembran, Tim23, verwendet, welche keine temperaturabhängige Aggregation aufwies.

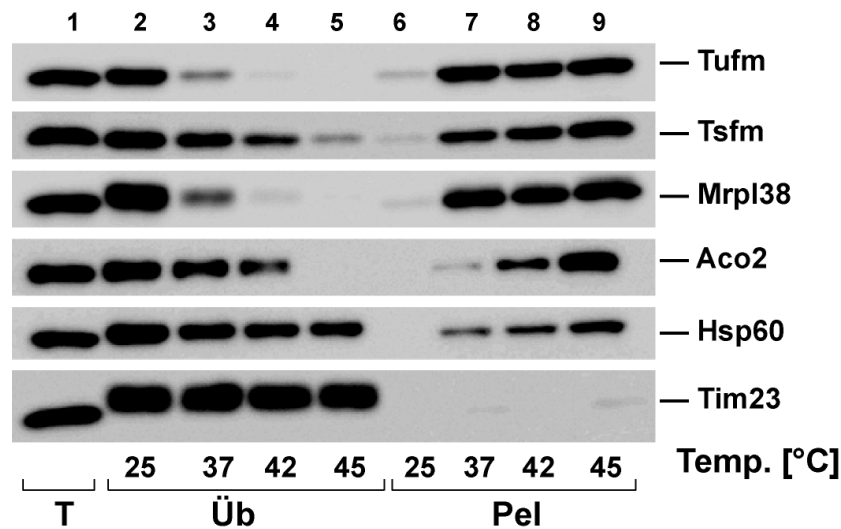


Abbildung 14: Proteinaggregation in isolierten Mitochondrien bei Hitzestress. Isolierte Mitochondrien wurden 20 min bei den angegebenen Temperaturen inkubiert, lysiert und die Aggregate mittels Zentrifugation (20 000 xg, 20 min, 4 °C) von der löslichen Proteinfraction getrennt. Das Gesamtlysat (T), die Überstände (Üb) sowie die Pellets (Pel) wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

Zusätzlich zur isolierten Mitochondrien wurden intakte HeLa Zellen Hitzestress ausgesetzt, um zu testen, ob das gleiche Aggregationsverhalten mitochondrialer Proteine ebenfalls in einer *in vivo* ähnlichen Situation zu beobachten ist. Nach einem einstündigen Hitzeschock von adhärenenten HeLa Zellen bei 45 °C im Inkubator (Kontrolle bei 37 °C) wurden die Zellen lysiert und aggregierte von löslichen Proteinen wie beschrieben isoliert. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der temperaturabhängigen Aggregation in isolierten Mitochondrien konnte bei dem Hitzestress intakter Zellen eine weitaus geringere Aggregation der untersuchten Proteine beobachtet werden (Abb. 15). Für den mitochondrialen Elongationsfaktor Tufm konnte lediglich eine geringe Aggregation bei 45 °C detektiert werden. Der Großteil des Proteins war in der löslichen Proteinfraction im Überstand nachzuweisen. Generell war eine Verringerung der Proteinmenge nach Hitzeschock im Überstand der untersuchten Proteine zu erkennen, insbesondere bei dem thermostabilen Kontrollprotein Tim23. Dies könnte auf Zellen hindeuten, die aufgrund der starken Stressbedingung die Apoptose einleiteten.

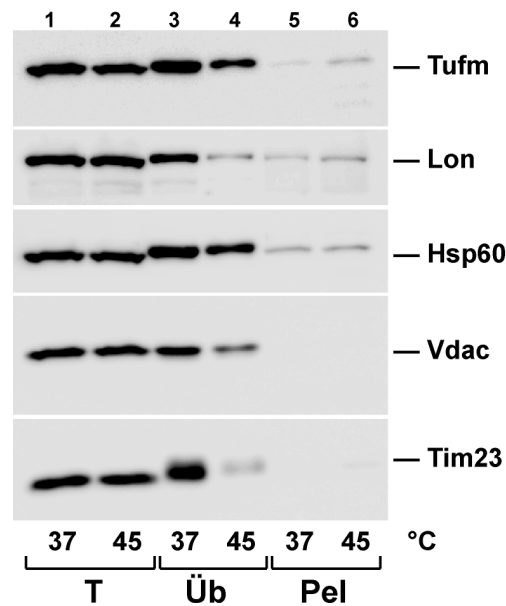


Abbildung 15: Proteinaggregation in Mitochondrien nach Hitzeschock von intakten HeLa Zellen. Adhärenzte HeLa Zellen wurden für 1 h bei 37 °C (Kontrolle) und 45 °C (Hitzestress) inkubiert. Nach der Zelllyse folgte die Auftrennung der Proteine mittels Ultrazentrifugation. Lösliche Proteine befanden sich im Überstand (Üb), aggregierte Proteine in der Pelletfraktion (Pel). Überstände, Pellets und Gesamtprotein (T) wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

5.3.2 Proteinaggregation bei oxidativem Stress

Neben der Auswirkung von Hitzestress auf das Aggregationsverhalten mitochondrialer Proteine wurde zudem der Einfluss von oxidativem Stress durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (engl.: reactive oxygen species (ROS)) in Mitochondrien untersucht. Hierfür wurden isolierte Mitochondrien mit verschiedenen Konzentrationen der ROS-induzierenden Chemikalie Menadion behandelt, einem Vitamin K₃ Metabolit, welches die Bildung von Superoxidradikalen hervorruft (Chaput et al., 1983). Anschließend wurden aggregierte und lösliche Proteine wie bereits beschrieben isoliert und analysiert. Die Matrixproteine Aco2 und Sod2 (engl.: superoxiddismutase) sowie das Außenmembranprotein Vdac (engl.: voltage-dependent anion-selective channel protein) zeigten keine Aggregation nach Menadionbehandlung (Abb. 16). Das Matrixchaperon Hsp60 hingegen aggregierte teilweise bei einer Inkubation mit 1 mM und 2 mM Menadion. Der mitochondriale Elongationsfaktor Tufm wies das stärkste Aggregationsverhalten auf und aggregierte konzentrationsabhängig bereits nach der Inkubation mit 0,5 mM Menadion. Der Vergleich mit der temperaturabhängigen Aggregation von Tufm (siehe 5.3.1) zeigte, dass unter oxidativen Stressbedingungen

weniger Tufm aggregierte und zudem lösliches Protein im Überstand detektierbar war. Dies lässt darauf schließen, dass der Elongationsfaktor eine höhere Sensitivität gegenüber erhöhten Temperaturen als gegenüber oxidativem Stress aufweist.

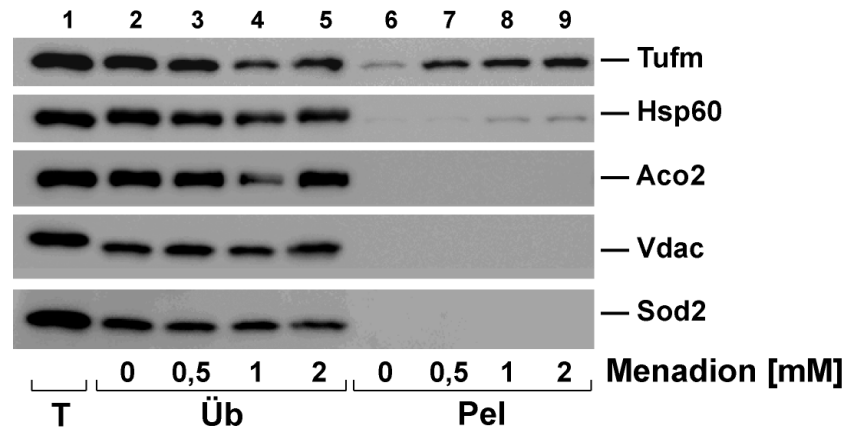


Abbildung 16: Proteinaggregation in isolierten Mitochondrien bei oxidativem Stress. Isolierte Mitochondrien wurden mit verschiedenen Menadionkonzentrationen (0-2 mM) für 20 min inkubiert und Proteinaggregate wurden wie bereits beschrieben isoliert und analysiert. T: Total. Üb: Überstand. Pel: Pellet.

Analog zu den Analysen des Hitzeschockeinflusses, wurde die Auswirkung von oxidativem Stress auf Mitochondrien in intakten HeLa Zellen getestet. Adhärente Zellen wurden für 90 min mit 0,5 mM Menadion bzw. dem entsprechenden Volumen Ethanol für die Kontrollprobe bei 37 °C behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Glas/Teflon-Homogenisators aufgeschlossen und die Mitochondrien mittels Zentrifugation isoliert. Es konnte eine deutliche Aggregation für die mitochondrialen Elongationsfaktoren Tufm und Tsfm nach der Menadion-Behandlung nachgewiesen werden (Abb. 17). Zudem konnten kaum lösliche Fraktionen dieser Proteine im Überstand detektiert werden. Das ribosomale Protein Mrpl38 wies sowohl unter Kontroll- als auch oxidativer Stressbedingung eine vollständige Aggregation auf, wohingegen das Matrixprotein Hsp60 lediglich zum Teil nach der Menadionbehandlung im Pellet zu finden war. Das Kontrollprotein Tim23 zeigte keine Menadion-abhängige Aggregation.

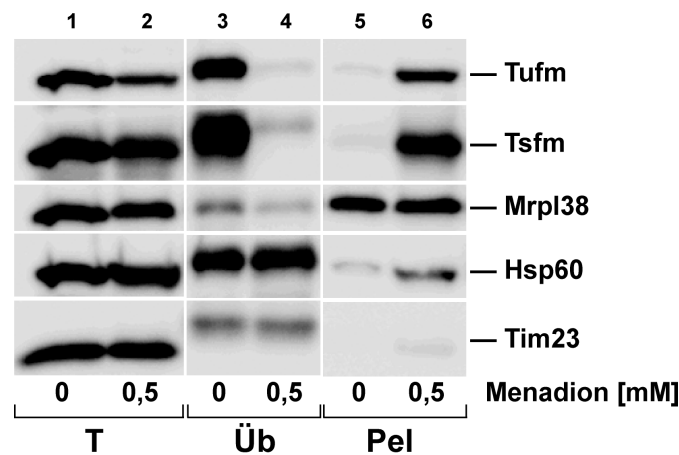


Abbildung 17: Proteinaggregation in Mitochondrien bei oxidativem Stress intakter HeLa Zellen. Inkubation von HeLa Zellen mit 0,5 mM Menadion bzw. mit dem entsprechenden Volumen Ethanol (Kontrolle) für 90 min bei 37 °C. Die Mitochondrien wurden aus den Zellen isoliert und aggregierte und löslichen Proteinen wie zuvor beschrieben isoliert. Die Gesamtproteinmengen (T), die Überstände (Üb) und die Pellets (Pel) mittels SDS-PAGE sowie Western Blot analysiert.

5.3.3 ATP- und GTP-Abhängigkeit der Proteinaggregation

Molekulare Chaperone stellen die bedeutendsten zellulären Enzyme dar, welche Proteine vor Aggregation schützen sowie die Rückfaltung Hitze-denaturierter Proteine vermitteln (Bukau et al., 2006). Da ein Großteil der Chaperone für ihre Aktivität ATP benötigen, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die Aggregation von Tufm in Abhängigkeit von ATP verläuft. Isolierte Mitochondrien wurden in An- und Abwesenheit von ATP sowie dem ATP-generierenden System, welches Kreatinkinase und Kreatinphosphat beinhaltete, hohen Temperaturen ausgesetzt. Obgleich sich ein Effekt für die hitzebedingte Aggregation von Hsp60 zeigte, welches eine erhöhte Stabilität in Anwesenheit von ATP aufwies, konnte kein Einfluss auf die temperaturbedingte Aggregation der Elongationsfaktoren Tufm und Tsfm sowie der Matrixproteine Mrpl38 und Aco2 festgestellt werden (Abb. 18 A). Dies könnte darauf hindeuten, dass jene fehlgefalteten Proteine nach Hitzestress nicht ATP-abhängig durch Chaperone zurückgefaltet werden.

Da es sich bei dem mitochondrialen Elongationsfaktor Tufm um eine GTPase handelt, welche die Hydrolyse von GTP als Energiequelle für die Konformationsänderung im Zuge des Transfers von Aminoacyl-tRNA zu der A-Stelle des Ribosoms benötigt (Cai et al., 2000), wurde zudem getestet, ob ein Einfluss von GTP auf die Stabilität von Tufm unter Hitzeschockbedingungen zu beobachten ist. Isolierte Mitochondrien wurden 20 min bei 25 °C oder 42 °C in An- und Abwesenheit von 2,5 mM GTP inkubiert. Wie in

Abbildung 18 B zu erkennen, konnte weder für Tufm noch für Tsfm eine GTP-Abhängigkeit der Thermostabilität nachgewiesen werden. Das ribosomale Protein Mrpl38 war bereits in der Pelletfraktion der Kontrollprobe in gleicher Menge wie nach Hitzestress nachzuweisen und zeigte ebenfalls keine GTP-Abhängigkeit des Sedimentationsverhaltens. Das Hitzeschockprotein Hsp60 aggregierte lediglich zu einem geringen Teil GTP-unabhängig, während Aco2 keine Aggregation nach Hitzestress aufwies. Das Kontrollprotein Tim23 war in geringem Maß, unabhängig von GTP, in der Pelletfraktion nach Hitzestress zu finden.

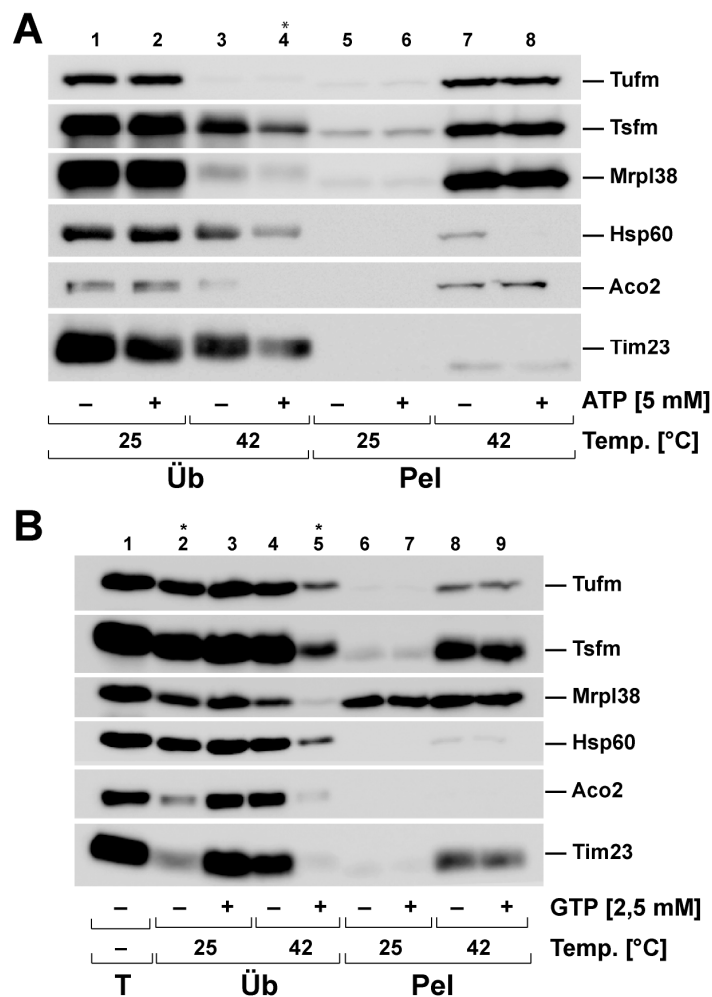


Abbildung 18: Nukleotidabhängigkeit der Proteinaggregation nach Hitzestress. A) ATP-Abhängigkeit der Proteinaggregation. Isolierte Mitochondrien wurden 20 min bei den angegebenen Temperaturen in An- und Abwesenheit von ATP sowie Kreatinkinase und Kreatinphosphat inkubiert. Der Stern in der Geltasche 4 markiert das Beladen mit weniger Ausgangsmaterial aufgrund von Materialverlust während der Versuchsprozedur. B) GTP-Abhängigkeit der Proteinaggregation. Isolierte Mitochondrien wurden 20 min bei 25 °C oder 42 °C in An- und Abwesenheit von 2,5 mM GTP inkubiert. Die Sterne in den Geltaschen 2 und 5 markieren das Beladen mit weniger Ausgangsmaterial.

5.3.4 Zeitabhängigkeit der Aggregation bei Hitzestress

Um ein genaueres Bild von der Kinetik der Aggregation mitochondrialer Proteine unter dem Einfluss von Hitzestress zu erhalten, wurden isolierte Mitochondrien für verschiedene Zeitpunkte von 0-60 min unter Hitzestress (42 °C) und Kontrollbedingungen (25 °C) inkubiert. Die aggregierten Proteine wurden durch Zentrifugation isoliert und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

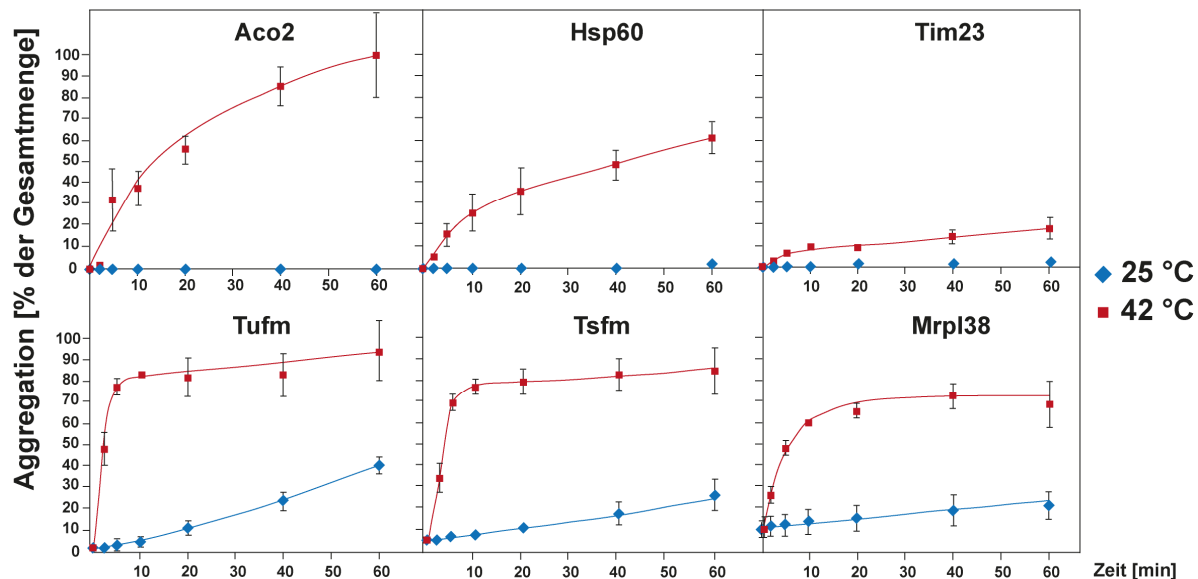


Abbildung 19: Zeitabhängige Aggregation mitochondrialer Proteine nach Hitzestress. Frisch isolierte Mitochondrien wurden für 0-60 min bei 25 °C und 42 °C inkubiert und die Proteinaggregate anschließend durch Zentrifugation bei 20 000 xg isoliert. Überstände und Pellets wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die dargestellten Werte repräsentieren die Mittelwerte und deren Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Die prozentuale Aggregation wurde aus dem Verhältnis der Menge des aggregierten Proteins und der Gesamtproteinmenge, welche sich aus der Summe von Überstand und Pellet ergab, errechnet.

Die Ergebnisse des Einflusses von Hitzestress verschiedener Dauer auf die Aggregation mitochondrialer Proteine zeigte, dass die mitochondrialen Elongationsfaktoren Tufm und Tsfm mit einer ähnlichen Kinetik aggregierten (Abb. 19). Beide Proteine begannen bereits nach 2-minütiger Inkubation bei 42 °C zu aggregieren und nach 5 min waren bereits 80 % von Tufm und 70 % von Tsfm in der Pelletfraktion zu detektieren. Diese Werte stiegen mit einem länger andauernden Hitzestress nicht bedeutend an, was auf ein sehr thermolabiles Verhalten bereits nach einer kurzen Hitzeschockperiode dieser Proteine schließen lässt. Das Ribosomprotein Mrpl38 wies eine vergleichbare Aggregationskinetik

auf. Bereits nach 5 min betrug die Menge an aggregierten Proteins 50 %, welche sich über die Zeit auf 70 % erhöhte. Des Weiteren zeigte Mrpl38 ebenfalls eine temperaturunabhängige Sedimentation, da 10 % des Proteins ohne Hitzeeinwirkung im Pellet detektiert werden konnte. Dies könnte auf eine teilweise Sedimentation des Proteins bei den verwendeten Zentrifugationsbedingungen aufgrund seiner Größe oder Assoziation mit dem Ribosom hindeuten. Die mitochondrialen Matrixproteine Aco2 und Hsp60 zeigten eine lineare Kinetik mit steigender Aggregation über die Zeit. Während lediglich 15-20 % der Proteine nach 5-minütigem Hitzeschock aggregierten, stieg dieser Anteil auf bis zu 90 % (Aco2) bzw. 60 % (Hsp60) nach 1 h Inkubation bei 42 °C an. Tim23 diente als Kontrolle für ein hitzestabiles Protein, welches nach einer Hitzebehandlung von 1 h noch zum Großteil löslich (> 80%) vorlag. Unter Kontrollbedingungen zeigten Tufm, Tsfm und Mrpl38 ebenfalls eine Aggregation von ungefähr 40 % (Tufm) beziehungsweise 20 % (Tsfm sowie Mrpl38) nach einstündiger Inkubation, was darauf schließen lässt, dass ebenfalls eine Inkubation bei 25 °C über einen längeren Zeitraum eine Stressbedingung für isolierte Mitochondrien darstellt.

Diese Ergebnisse zeigen ein hohes temperatursensitives Aggregationsverhalten der Elongationsfaktoren Tufm und Tsfm sowie des Ribosomproteins Mrpl38 bereits nach kurzer Inkubation isolierter Mitochondrien bei erhöhten Temperaturen.

5.3.5 Sedimentationseigenschaften der Aggregate nach Hitzestress

Zur weiteren Analyse der Beschaffenheit der hitzeinduzierten Aggregate der mitochondrialen Elongationsfaktoren, wurde die Größe bzw. Dichte der Aggregate mittels differenzieller Zentrifugation näher untersucht. Isolierte Mitochondrien wurden, wie zuvor beschrieben, hitzestress und die aggregierten Proteine wurden nach der Lyse der Mitochondrien mittels verschiedener Zentrifugationsschritte fraktioniert, um zu bestimmen, bei welcher Zentrifugationskraft die Proteinaggregate pelletierten.

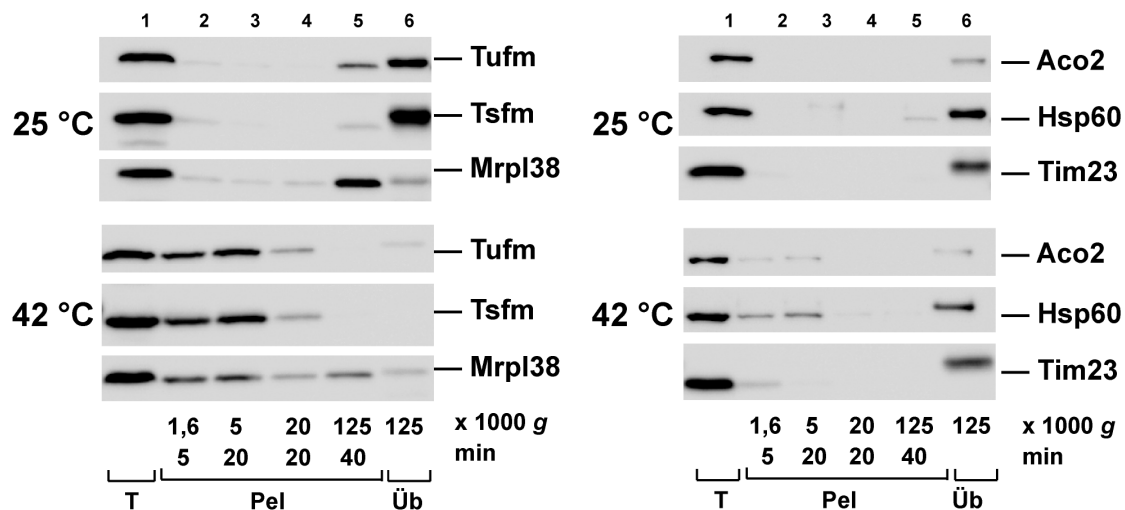


Abbildung 20: Analyse der Aggregate nach Hitzestress mittels differenzieller Zentrifugation. Isolierte Mitochondrien wurden für 20 min unter Kontroll- (25 °C) und Hitzeschockbedingungen (42 °C) inkubiert und anschließend lysiert. Aggregierte Proteine wurden mittels differenzieller Zentrifugation fraktioniert. Es wurden Zentrifugationsschritte verschiedener Länge und Geschwindigkeit für die gleiche Probe angewendet, indem der Überstand zu dem nächsten Zentrifugationsschritt überführt wurde.

Tufm sowie Tsfm lagen unter Kontrollbedingungen löslich vor und es konnte lediglich eine geringe Menge an Aggregaten in der Pelletfraktion nach einer Zentrifugation bei 125 000 xg detektiert werden (Abb. 20 links). Nach Hitzeschock hingegen war bereits der Großteil der Aggregate bei einem niedrigen Zentrifugationsschritt (1600 xg, 5 min) im Pellet zu finden. Dies lässt auf eine hohe Dichte und Größe der hitzeinduzierten Aggregate schließen. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 20 000 xg sedimentierten Tufm und Tsfm bereits vollständig ins Pellet. Daher diente dieser Zentrifugationsschritt in den folgenden Experimenten dieser Arbeit als Standardbedingung für die Isolation von Aggregaten.

Um zu verifizieren, dass der mitochondriale Translationsfaktor nicht aufgrund seiner Bindung an das Ribosom während der Elongation im Translationsprozess aggregierte, wurde der Verlauf der Sedimentation von Tufm mit dem des ribosomalen Proteins Mrpl38 verglichen. Im Gegensatz zu Tufm konnte Mrpl38 in allen Zentrifugationsfraktionen nachgewiesen werden. Dies lässt auf eine echte Aggregation von Tufm unabhängig vom Sedimentationsverhalten ribosomaler Proteine schließen. Mrpl38 zeigte zudem bereits unter Kontrollbedingungen eine Tendenz zu sedimentieren und war in vernachlässigbaren Mengen in der löslichen Fraktion nach Ultrazentrifugation zu finden.

Im Gegensatz zu der starken Aggregatbildung von Tufm, Tsfm und Mrpl38 unter dem Einfluss von Hitzestress, wiesen die Matrixproteine Aco2 und Hsp60 einen geringen Teil an unlöslichen Proteinen nach Hitzeschock auf. Die gebildeten Aggregate waren bereits nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 20 000 xg im Pellet zu finden (Abb. 20 rechts).

Die Sedimentationseigenschaften der hitzeinduzierten Aggregate wurden weiterführend mittels Dichtegradientenzentrifugation analysiert, um weitere Aussagen über die Dichte der gebildeten Aggregate treffen zu können und zudem das unabhängige Sedimentationsverhalten von Tufm von dem Ribosom zu verifizieren. Isolierte Mitochondrien wurden bei verschiedenen Temperaturen inkubiert und die Proteine anschließend durch Sucrose-Dichtezentrifugation aufgetrennt. Mit Hilfe des Dichtegradienten konnten lösliche Proteine, welche sich in den ersten Fraktionen mit geringer Sucrosekonzentration befanden, von aggregierten Proteinen, welche aufgrund der erhöhten Dichte in die Fraktionen hoher Sucrosekonzentration migrierten, getrennt werden (Abb. 21). Unter den Kontrollbedingungen lagen alle untersuchten Proteine löslich vor, da der Großteil der Proteinmenge in den ersten 4 Fraktionen detektiert werden konnte. Lediglich Tufm war zu einem geringen Teil in Fraktionen höherer Sucrose-Konzentration zu detektieren. Bereits nach leichter Erhöhung der Temperatur auf 37 °C konnten für Tufm sowie Tsfm vermehrt Aggregate in Fraktion 16 und 17 sowie 22 und 23 nachgewiesen werden. Die Aggregate beider Proteine wiesen eine ähnliche Verteilung im Dichtegradienten auf, und deren Menge nahm mit steigender Temperatur parallel zu. Während für Tufm und Tsfm bei einem Hitzeschock bei 42 °C und 45 °C kein lösliches Protein mehr nachzuweisen war, konnte lösliches Protein von Mrpl38 sowie Hsp60 teilweise in den Fraktionen geringer Sucrose-Konzentration detektiert werden. Der Unterschied des Verlaufs der Aggregatbildung zwischen Tufm und Mrpl38 unterstützt das vorherige Ergebnis (siehe 5.3.5), dass Tufm unabhängig von dem Ribosom aggregierte. Das Kontrollprotein Tim23 konnte nach Hitzeschock nicht in den Fraktionen hoher Sucrosekonzentration nachgewiesen werden und zeigte somit keine Bildung von Aggregaten.

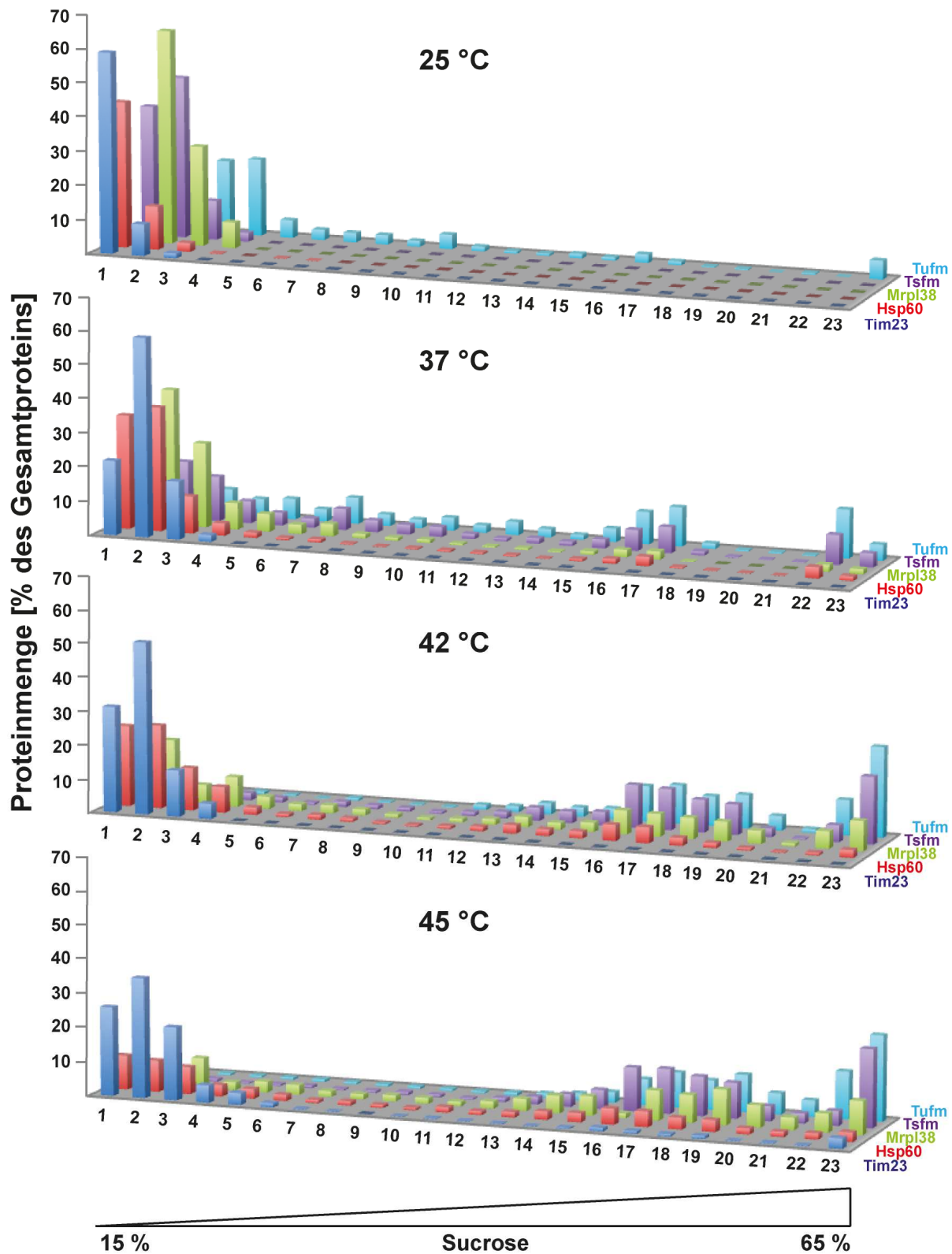


Abbildung 21: Analyse der Aggregate nach Hitzestress mittels Sucrose-Dichtezentrifugation. Mitochondrien wurden für 20 min bei verschiedenen Temperaturen inkubiert, lysiert und die Proteine mittels eines 15 % - 65 %igen Sucrosegradienten aufgetrennt (200 000 xg, 1 h, 4 °C). Nach der Fraktionierung des Gradienten (Fraktion 1-23) wurden die einzelnen Fraktionen mittels Western Blot analysiert. Dargestellt ist die Quantifizierung der Proteine Tim23 (blau), Hsp60 (rot), Mrpl38 (grün), Tsfm (lila) und Tufm (türkis).

5.3.6 Untersuchung der Assoziation von Tufm und dem Ribosom unter Hitzestress

Als weitere Untersuchung, ob Tufm unter dem Einfluss von Hitzestress mit dem mitochondrialen Ribosom assoziiert vorlag, wurde der Einfluss hoher Salzkonzentrationen auf die Löslichkeit des mitochondrialen Translationsfaktors bestimmt. Hierfür wurden die aggregierten Proteine nach Hitzeschock mit verschiedenen Salzkonzentrationen inkubiert. Ionische Bindungen würden im Fall einer Assoziation von Tufm und dem Mitoribosom durch eine hohe Salzkonzentration zerstört werden und somit Tufm wieder löslich vorliegen.

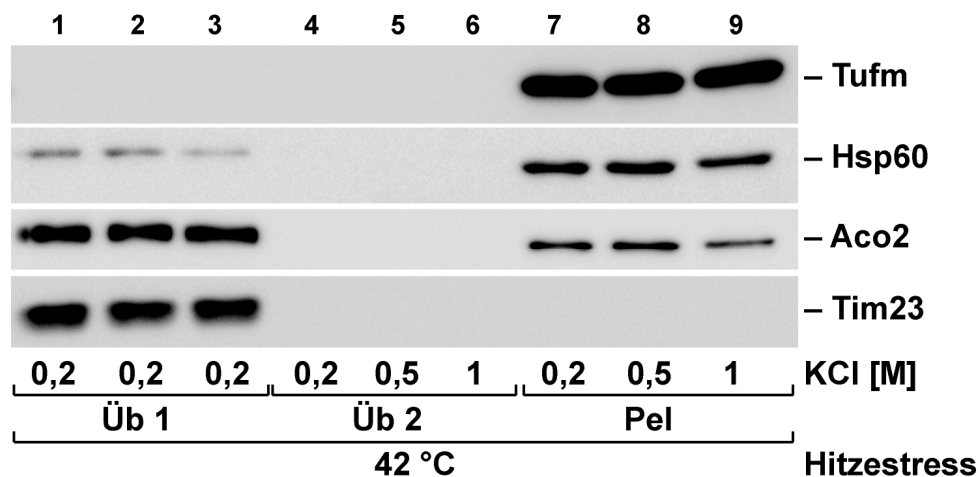


Abbildung 22: Untersuchung der Assoziation von Tufm und dem Ribosom bei Hitzestress. Isolierte Mitochondrien wurden nach 20-minütigem Hitzestress mit Puffer geringer Salzkonzentration (0,2 M KCl) lysiert und lösliche Proteine (Üb 1) und Proteinaggregate mittels Zentrifugation getrennt. Die Aggregatpellets wurden mit Lysisbuffer verschiedener Salzkonzentration (0,2 M, 0,5 M und 1 M KCl) reextrahiert und erneut mittels Zentrifugation in lösliche (Üb 2) und unlösliche Proteine (Pel) getrennt.

Die Löslichkeit des mitochondrialen Elongationsfaktors Tufm nach Hitzestress zeigte in Anwesenheit erhöhter Salzkonzentrationen keine Veränderung (Abb. 22). Tufm aggregierte nach einem Hitzeschock bei 42 °C vollständig und wurde durch die Inkubation bei hoher Salzkonzentration nicht wieder löslich. Dies lässt darauf schließen, dass Tufm nicht über ionische Bindungen mit dem Mitoribosom assoziiert vorliegt, da diese durch die hohe Salzkonzentration zerstört werden würden. Dies ist ebenfalls für die Matrixproteine Hsp60, welches ebenfalls fast vollständig aggregierte, sowie Aco2, das teilweise bei Hitzestress aggregierte, zu beobachten. Das Kontrollprotein Tim23 wies keine temperaturabhängige Aggregation auf.

5.3.7 Proteinase K-Resistenz der Tufm Aggregate nach Hitzeschock

Als Nachweis, dass es sich bei der nach Hitzeschock sedimentierten Proteinfraction von Tufm um tatsächliche Aggregate und nicht um Proteinkomplexe handelte, die aufgrund ihrer Größe sedimentierten, wurde ein proteolytischer Verdau mit Proteinase K (PK) durchgeführt. Bei Proteinase K handelt es sich um eine Serinendopeptidase, welche unselektiv Peptide verdaut. Aggregate zeichnen sich meist durch eine erhöhte Resistenz gegenüber PK und teilweise durch eine Unlöslichkeit in SDS aus.

Um die PK-Resistenz der sedimentierten Tufm Proteinfraction nach Hitzestress zu untersuchen, wurden isolierte Mitochondrien lysiert und mit unterschiedlichen Konzentrationen von PK für verschiedene Zeitpunkte inkubiert. Während Tufm unter Kontrollbedingungen vollständig durch PK verdaut wurde, zeigte das Protein nach Hitzeschock eine Resistenz gegenüber dem proteolytischen Verdau (Abb. 23). Dies lässt darauf schließen, dass es sich um echte hitzeinduzierte Aggregate handelte, die bei den untersuchten PK-Konzentrationen eine Resistenz aufwiesen, jedoch sensitiv gegenüber SDS sind, da sie erfolgreich mittels SDS-PAGE aufgetrennt werden konnten.

Das mitochondriale Matrixprotein Trap1 wurde sowohl in der Kontrolle als auch in der hitzegeschockten Probe nicht durch PK verdaut, was auf eine intrinsische Protease-Resistenz hindeutet.

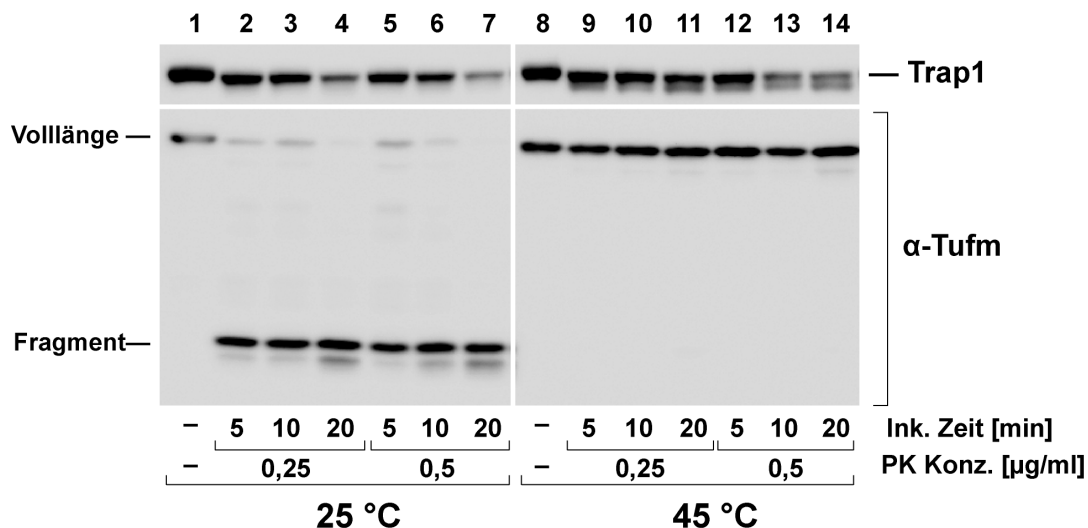


Abbildung 23: Proteinase K-Resistenz von Tufm Aggregaten nach Hitzeschock. Isolierte Mitochondrien wurden für 20 min bei 25 °C und 42 °C inkubiert, mit 0,5 % Triton-haltigem Lysispuffer lysiert und mit 0,25 µg/ml oder 0,5 µg/ml Proteinase K für verschiedene Zeitpunkte inkubiert.

5.3.8 Regeneration aggregierter Proteine nach Hitzeschock

Nachdem bereits gezeigt wurde, dass die Elongationsfaktoren nach 20-minütigen Hitzeschock vollständig aggregiert vorliegen, wurde untersucht, ob die Löslichkeit und somit auch die Funktionalität des Proteins wiederhergestellt werden kann. Um dies zu untersuchen, wurden isolierte Mitochondrien nach dem Hitzeschock für 15, 60 und 120 min bei 30 °C inkubiert. Während dieser „Erholungszeit“ wurden den Mitochondrien Energie in Form von ATP sowie dem ATP-generierenden System (Kreatinkinase und Kreatinphosphat) bereitgestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass keine Solubilisierung der Aggregate von Tufm, Tsfm, Mrpl38, Hsp60 und Aco2 zu beobachten war (Abb. 24). Daraus lässt sich schließen, dass in dem untersuchten Zeitraum von 2 h in isolierten Mitochondrien keine Regeneration der mitochondrialen Proteine, die eine thermosensitive Aggregation aufwiesen, erfolgte.

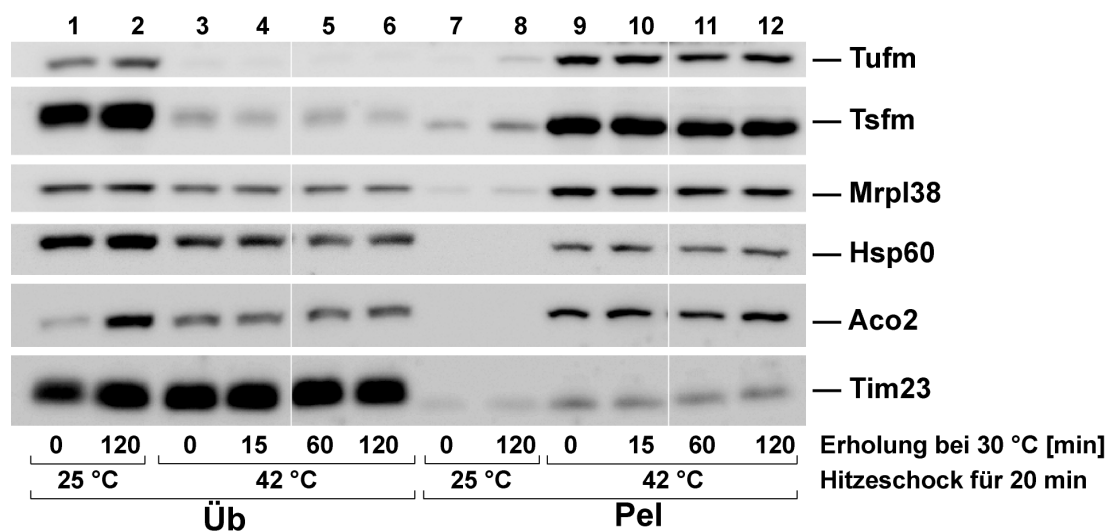


Abbildung 24: Regeneration aggregierter Proteine nach Hitzeschock. Isolierte Mitochondrien wurden für 20 min bei 25 °C und 42 °C und anschließend für verschiedene Zeitspannen bei 30 °C zur Wiederherstellung der Proteinlöslichkeit („Erholung“) inkubiert.

5.3.9 Degradation mitochondrialer Proteine bei Hitzestress

Um zu untersuchen, ob mitochondriale Proteine, unter dem Einfluss von Hitzestress durch mitochondriale Proteasen abgebaut werden, wurden die Proteinlevel verschiedener Proteine über einen Zeitraum von 6 h bei Hitzeschock sowie unter Kontrollbedingungen getestet. Der Fokus lag hier auf den Elongationsfaktoren Tufm und Tsfm, um zu

verifizieren, dass der Verlust an löslichem Protein nach Hitzeschock auf die Aggregation der Proteine und nicht auf proteolytischen Abbau zurückzuführen ist.

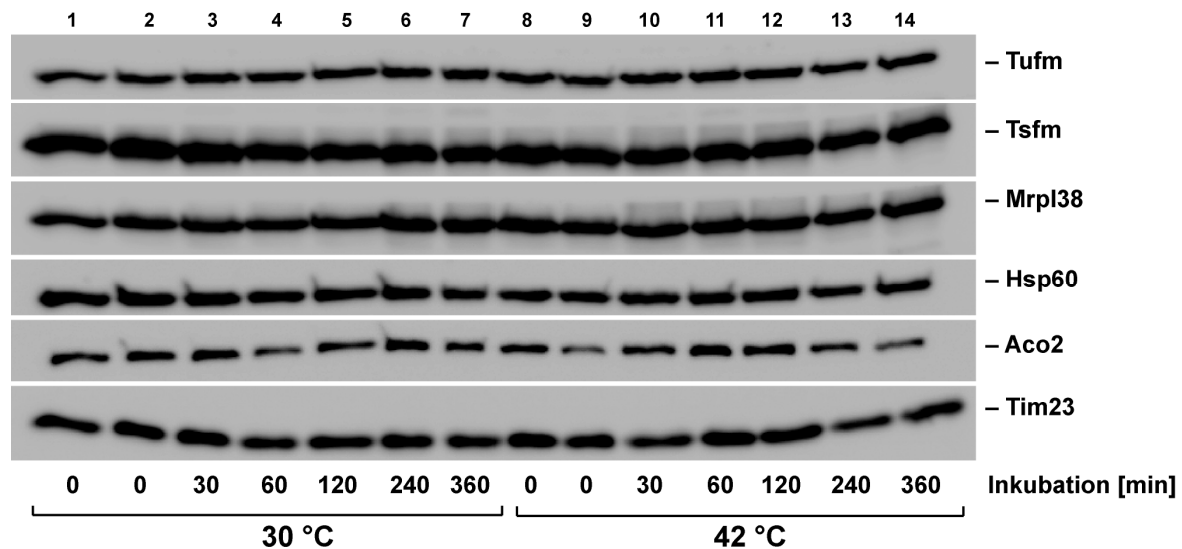


Abbildung 25: Degradation mitochondrialer Proteine bei Hitzestress. Intakte, energiereiche Mitochondrien wurden bis zu 6 h bei 30 °C (Kontrolle) und 42 °C (Hitzestress) inkubiert und die Gesamtproteinmenge nach TCA Fällung mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

Die Proteinmengen der untersuchten mitochondrialen Proteine verringerten sich weder unter den Kontrollbedingungen noch unter dem Einfluss erhöhter Temperatur (Abb. 25). Auch nach einer Inkubation von 6 h bei 42 °C waren die Proteinmengen von Tufm und Tsfm nicht verringert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Proteine bei Hitzestress nicht proteolytisch abgebaut wurden.

5.4 Auswirkungen von Hitzestress auf die mitochondriale Funktion

Neben der Untersuchung der Hitzestabilität des mitochondrialen Proteoms, wurden weiterführend die Auswirkungen erhöhter Temperaturen auf die Funktionalität der Mitochondrien untersucht.

5.4.1 Mitochondriale Translationskontrolle bei Hitzestress

Da die Hauptfunktion des Elongationsfaktors Tu in den Mitochondrien die Bereitstellung der Aminoacyl-tRNA an der A-Stelle des Ribosoms während der Elongationsphase der Proteintranslation ist (Cai et al., 2000), stand die Untersuchung einer Korrelation der

thermisch bedingten Aggregation von Tufm und der Auswirkung von Hitzestress auf die mitochondriale Translation im Fokus dieser Arbeit.

Zur Untersuchung der Translation der 13 mitochondrial kodierten Proteine unter *in organello* Bedingungen, wurden isolierte Mitochondrien für verschiedene Zeitperioden hitzegeschockt und anschließend mittels der [³⁵S]-markierten Aminosäuren Methionin und Cystein für 45 min radioaktiv markiert, um die Bildung neu synthetisierter mitochondrialer Proteine verfolgen zu können.

In Abbildung 26 ist die Menge an neu synthetisierten Polypeptiden unter Kontrollbedingungen im Vergleich zu dem Einfluss von Hitzestress verschiedener Dauer gezeigt. Unter Normalbedingungen konnten die Proteinbanden der 13 mitochondrial kodierten Proteine anhand von Literaturergebnissen (Chomyn, 1996) zugeordnet werden. Die detektierten Proteine konnten als die Untereinheiten der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe NADH-Dehydrogenase, Cytochrom-c-Oxidase, Cytochrom-bc1-Komplex und der ATP-Synthase identifiziert werden (Abb. 26 A links). Jene Banden fanden sich auch in der Probe wieder, welche lediglich 2 min dem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt war. Erhöhte sich die Dauer des Hitzeschocks auf 5 min so war eine deutliche Reduktion der Bandenintensität und somit der Menge an neu synthetisierten Proteinen festzustellen. Nach 10 und 20 min Hitzestress waren keine deutlichen Proteinbanden mehr zu erkennen. Die Kontrollproben, welche mit Chloramphenicol zur Hemmung der mitochondrialen Translation und Cycloheximid zur Inhibierung der Translation im Zytosol inkubiert wurden, wiesen jeweils keine Bildung neu synthetisierter Proteine auf. Dies zeigt, dass eine Cycloheximidbehandlung ebenso in einer Beeinträchtigung der mitochondrialen Translation resultierte, wie dies bereits in früheren Studien beschrieben wurde (Satav et al., 1977). Die Quantifizierung von drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten zeigte, dass es einen klaren Zusammenhang zwischen der Dauer des Hitzestresses und der mitochondrialen Translationseffizienz gibt (Abb. 26 B). Nach einem fünfminütigen Hitzestress waren bereits 40 %, weniger Translationsprodukte zu detektieren und nach 20 min Hitzestress wurden 80 % weniger mitochondriale Proteine neu synthetisiert.

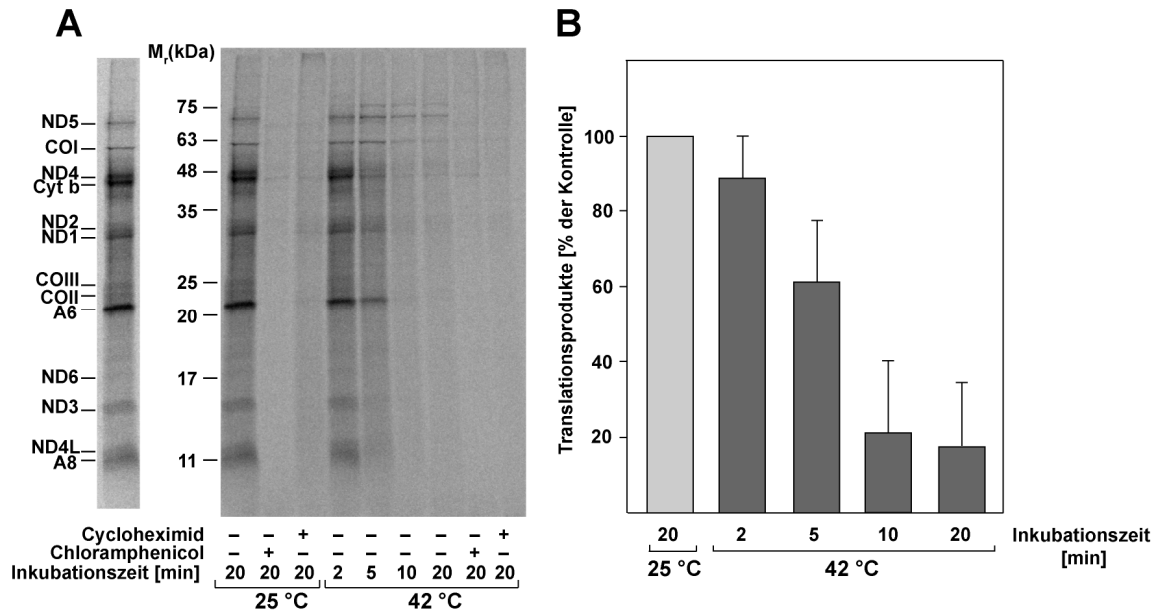


Abbildung 26: *In organello* Translation mitochondrial kodierter Proteine nach Hitzeschock. A) Isolierte Mitochondrien wurden bei 25 °C oder 42 °C für bis zu 20 min hitzegeschockt und anschließend mit [35 S]-Met/Cys für 45 min bei 30 °C radioaktiv markiert. Wenn gekennzeichnet wurden die Proben vorher zur Inhibierung der zytosolischen und mitochondrialen Translation mit Cycloheximid bzw. Chloramphenicol behandelt. Die Proben wurden mittels eines 15 %-igen Urea-SDS-Gels aufgetrennt und durch digitale Autoradiographie detektiert. Links: Zuordnung der jeweiligen mitochondrial kodierten Untereinheit der Proteinkomplexe. ND1, ND2, ND3, ND4 ND4L, ND5 und ND6 bezeichnen die Untereinheiten 1, 2, 3, 4, 4L, 5 und 6 der NADH-Dehydrogenase. COI, COII und COIII kennzeichnen die Untereinheiten I, II und III der Cytochrom-c-Oxidase. Cytb bezeichnet eine Komponente des Cytochrom-bc1-Komplexes. A6 und A8 stellen Untereinheiten der ATP-Synthase dar. B) Quantitative Analyse der *in organello* Translation mitochondrial kodierter Proteine nach Hitzeschock im Vergleich zu der Kontrolle bei 25 °C (100 %). Bei den Werten handelt es sich um Mittelwerte und deren Standardabweichung ($n = 3$).

5.4.2 Regeneration der Translation nach Hitzestress

Nachdem gezeigt wurde, dass in hitzestresssten HeLa Zellen nach einer Erholungsphase von 2 h die zytosolische Proteinsynthese fast vollständig wieder hergestellt werden konnte (Duncan & Hershey, 1984), wurde getestet, ob dies in isolierten HeLa Mitochondrien für die mitochondriale Translation ebenfalls zu beobachten ist. Intakte, energiereiche Mitochondrien, wurden nach einem 20-minütigen Hitzeschock für bis zu 2 h bei 25 °C inkubiert („Erholung“) und anschließend die Neusynthese mitochondrialer Proteine wie zuvor beschrieben *in organello* getestet.

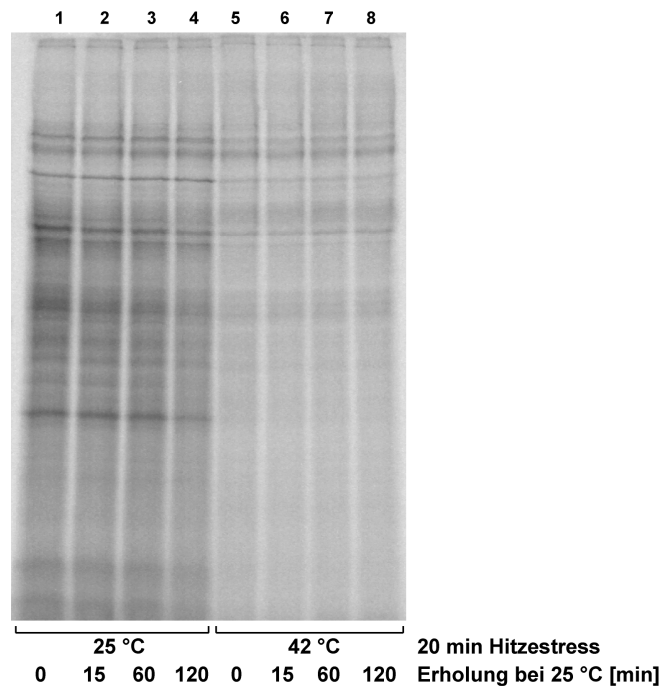


Abbildung 27: *In organello* Translation nach Hitzestress und Erholungsphase. Frisch isolierte, energiereiche HeLa Mitochondrien wurden für 20 min bei 25 °C sowie 42 °C und anschließend für verschiedene Zeitpunkte bei 25 °C („Erholung“) inkubiert. Neu synthetisierte Proteine wurden mittels [^{35}S]-Met/Cys für 45 min bei 30 °C radioaktiv markiert. Die Proben wurden mittels eines 15 %-igen Urea-SDS-Gels aufgetrennt und durch digitale Autoradiographie detektiert.

Die Neusynthese mitochondrialer Proteine ging wie zuvor gezeigt nach einem 20-minütigen Hitzeschock im Vergleich zu der Kontrollbedingung deutlich zurück (Abb. 27). Es konnte gezeigt werden, dass die mitochondriale Translation nach Hitzeschock isolierter Mitochondrien auch nach einer Erholungsphase von 2 h nicht regeneriert werden konnte.

5.4.3 Mitochondriale Importeffizienz bei Hitzestress

Mitochondrien synthetisieren lediglich 13 mitochondrial kodierte Proteine selbst und sind daher auf den Import zytosolischer, im Nukleus kodierter Proteine angewiesen (Mick et al., 2011). Somit sind sowohl Proteine, die in den Mitochondrien translatiert werden, als auch importierte Proteine notwendig, um die Komplexe der Atmungskette aufzubauen.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass nach dem Einfluss von Hitzestress die mitochondriale Proteintranslation zum Erliegen kommt (Abb. 26), wurde im Folgenden untersucht, ob zytosolische Proteine bei Hitzestress weiterhin in die Mitochondrien importiert werden können.

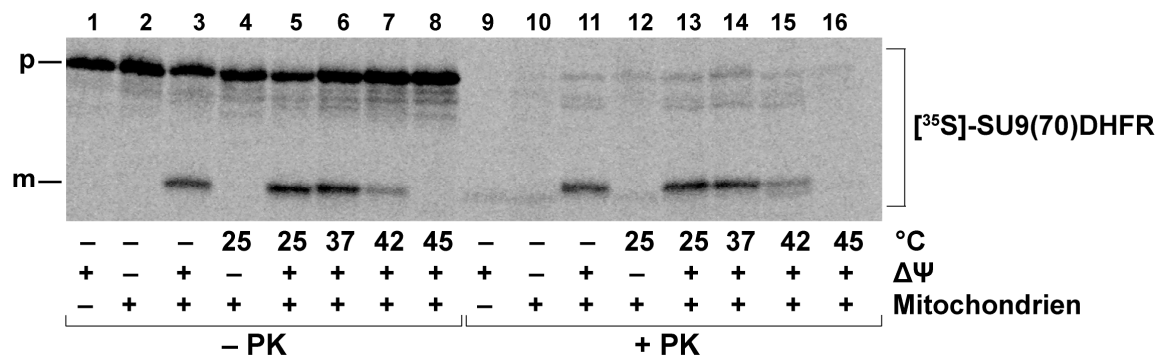


Abbildung 28: *In vitro* Import nach Hitzestress. *In vitro* Import von [³⁵S]-Met/Cys-markiertem SU9(70)DHFR in isolierte energiereiche Mitochondrien nach der Inkubation bei den angegebenen Temperaturen. Der Import wurde unter Standardbedingungen durchgeführt. Wenn gekennzeichnet wurde das Membranpotenzial vor der Importreaktion gehemmt (-ΔΨ). Nicht importiertes Protein wurde nach der Importreaktion mittels Proteinase K [f. c. 50 µg/ml] verdaut. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE analysiert und durch digitale Autoradiographie detektiert. p: Prä-Protein. m: reifes Protein ohne Präsequenz.

Nachdem isolierte Mitochondrien für 20 min bei verschiedenen Temperaturen inkubiert wurden, wurde ein *in vitro* Import von [³⁵S]-Met/Cys markierten SU9(70)DHFR in energiereiche Mitochondrien durchgeführt. Nicht importiertes Protein wurde mittels Proteinase K verdaut. Des Weiteren wurde bei der Kontrollprobe das Membranpotenzial der Mitochondrien vor der Importreaktion gehemmt (-ΔΨ). Betrachtet man die Menge an importierten Proteinen (gekennzeichnet mit m (engl.: mature) für das reife, prozessierte Protein ohne Präsequenz), so ist zu erkennen, dass diese sich mit steigender Temperatur verringert (Abb. 28). Wohingegen die Importeffizienz nach einer Inkubation bei 37 °C vergleichbar mit der Kontrollbedingung bei 25 °C war, zeigte sich, dass diese nach einem Hitzeschock bei 42 °C deutlich zurückging und nach einem starken Hitzeschock bei 45 °C vollständig gehemmt vorlag.

Diese Ergebnisse zeigen, dass nicht nur die Neusynthese mitochondrial kodierter Proteine, sondern auch der Import zytosolischer Proteine in die Mitochondrien unter dem Einfluss von Hitzestress zum Erliegen kommt.

5.4.4 Aggregation frisch importierter Proteine nach Hitzeschock

Zur Analyse der Aggregationstendenz von frisch importierten Proteinen im Vergleich zu bereits vollständig gefalteten, endogenen Proteinen, wurde ein *in vitro* Ko-Import von [³⁵S]-Met/Cys markierten mitochondrialen Matrixproteinen Trap1 und Mdh2 in energiereiche isolierte Mitochondrien durchgeführt. Anschließend wurden die Mitochondrien direkt erhöhten Temperaturen ausgesetzt, um die Proteinaggregation zu

induzieren. Die frisch importierten Proteine [^{35}S]-Trap1 und [^{35}S]-Mdh2 wurden mittels digitaler Autoradiographie detektiert und die endogenen Proteine Trap1 und Mdh2 durch Immunodekoration analysiert. Da die Menge an radioaktiv markiertem, importiertem Protein zu gering ist, um diese mit Hilfe von Antikörpern zu detektieren, kann davon ausgegangen werden, dass beide Zustände der Proteine voneinander unterschieden werden können.

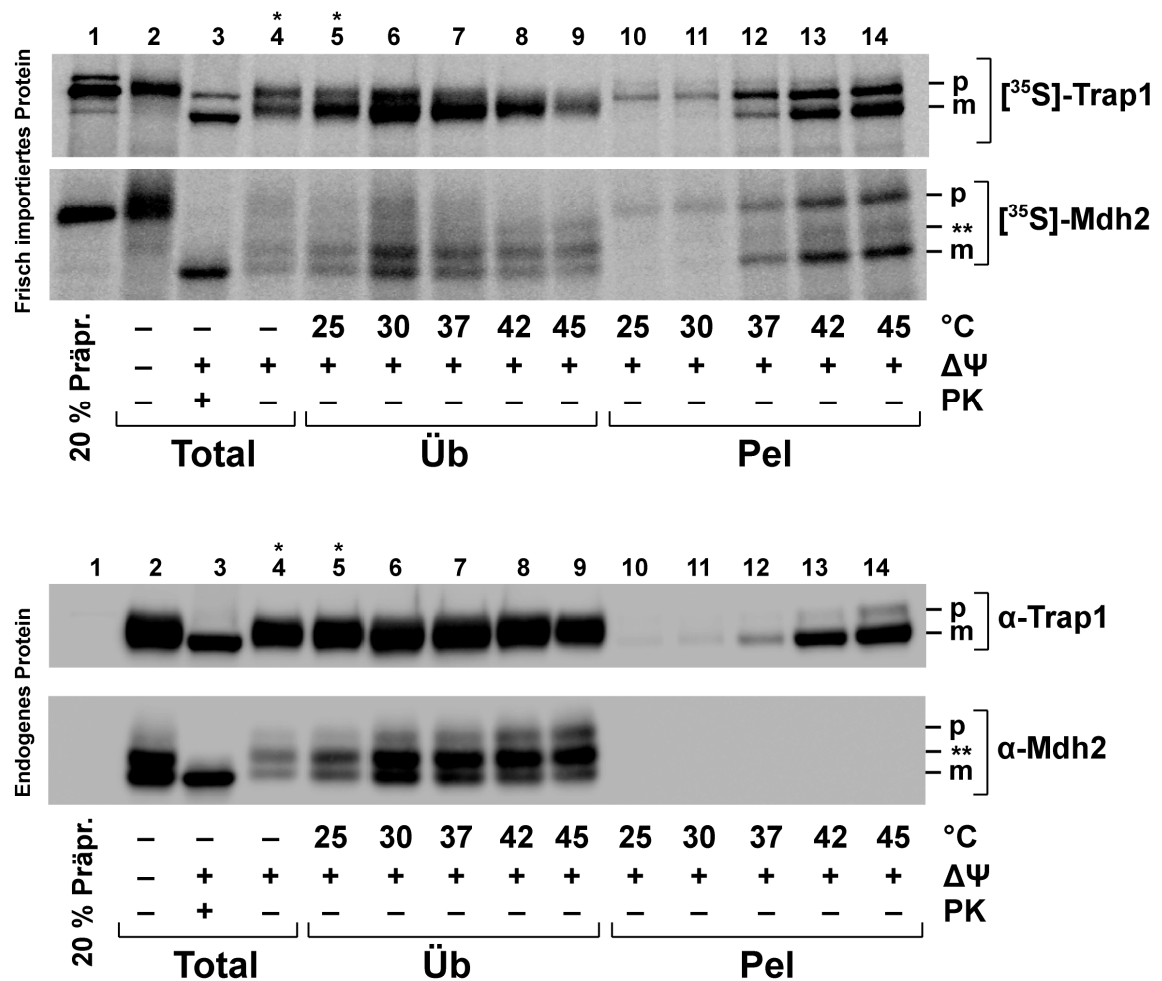


Abbildung 29: Vergleich der mitochondrialen Proteinaggregation nach Hitzeschock von frisch importierten Proteinen mit endogenen Proteinen. *In vitro* Ko-Import von [^{35}S]-Met/Cys-markierten Trap1 und Mdh2 in energiereiche, isolierte Mitochondrien und darauffolgender Hitzestress bei den angegebenen Temperaturen. Die frisch importierten Proteine [^{35}S]-Trap1 und [^{35}S]-Mdh2 wurden mittels digitaler Autoradiographie und die endogenen Proteine Trap1 and Mdh2 durch Immunodekoration detektiert. Die Sterne in den Geltaschen 4 und 5 markieren das Beladen mit weniger Ausgangsmaterial aufgrund von Materialverlust in der Versuchsprozedur. p: Prä-Protein. m: reifes Protein. **: teilweise importiertes Protein.

Für die frisch importierten Proteine konnte eine temperaturabhängige Aggregation nachgewiesen werden (Abb. 29 oben). Nach einer Inkubation bei 37 °C konnte frisch importiertes Trap1 und Mdh2 sowohl als Aggregate in der Pelletfraktion als auch löslich im Überstand nachgewiesen werden. Die Menge an aggregiertem Protein stieg bei einem Hitzestress von 42 °C und 45 °C weiter an, wohingegen die Menge an löslichem Protein zurückging. Das gleiche Aggregationsverhalten könnte ebenfalls für das endogene Trap1 beobachtet werden, welches ebenso wie das frisch importierte Protein mit ansteigender Temperatur aggregierte und somit auf eine Hitzelabilität schließen lässt (Abb. 29 unten). Im Gegensatz dazu zeigte die endogene Malatdehydrogenase keine Aggregation und blieb auch bei einem starken Hitzeschock von 45 °C löslich. Dies stellt einen deutlichen Kontrast zu dem Aggregationsverhalten des frisch importierten Mdh2 dar und weist somit auf einen Unterschied in der Thermostabilität von frisch importierten, noch teilweise ungefalteten Proteinen im Vergleich zu fertig gefalteten, endogenen Proteinen hin.

6 Diskussion

Organismen sind in der Lage, eine Vielzahl von Stressbedingungen, wie zum Beispiel Hitzestress, zu überleben, auch wenn dies zu vorübergehenden Schäden wichtiger zellulärer Strukturen und Funktionen führt. In der Forschung wurden viele Effekte von Hitzestress auf die Organisation eukaryotischer Zellen beschrieben, deren Ursache häufig in der Denaturierung und Fehlfaltung von Proteinen begründet liegt, welche zur Bildung von Aggregaten führen kann (Richter et al., 2010). Im Gegensatz dazu ist wenig über die Auswirkungen erhöhter Temperaturen auf das mitochondriale Proteom bekannt. Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt daher auf der Untersuchung der Hitzesensibilität von Proteinen in Säugetiermitochondrien.

6.1 Effekte von Stress auf die Morphologie und Funktion humaner Mitochondrien

Zunächst wurden die Auswirkungen verschiedener Stressbedingungen auf die mitochondriale Morphologie und Funktion untersucht. Mitochondrien gesunder Säugetierzellen zeichnen sich durch ein gleichmäßig in der Zelle verteiltes, tubuläres, dynamisches Netzwerk aus (Lackner, 2014). Innerhalb dieser Arbeit konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie intakter HeLa Zellen eine morphologische Veränderung des Netzwerkes der Mitochondrien nach Hitzestress beobachtet werden. Die Struktur veränderte sich von einer charakteristischen, netzartigen hin zu einer kondensierten, am Nukleus gelegenen Struktur. Hierbei zeigte sich eine verstärkte Lokalisation der Mitochondrien nahe des Zellkerns, wohingegen die Anzahl der Mitochondrien in der Zellperipherie abnahm. Diese Beobachtungen der veränderten Morphologie des Mitochondrien-Netzwerkes stimmen mit früheren elektronenmikroskopischen Studien überein, welche zeigten, dass eine dreistündige Hitzebehandlung (42 °C) von Säugetierzellen in einem Anschwellen der Mitochondrien sowie in deren veränderter intrazellulärer Verteilung resultierte. Darüber hinaus wurde in der Studie neben der Kondensation der Mitochondrien am Nukleus eine hitzebedingte Schädigung des Zytoskeletts gezeigt (Welch & Suhan, 1985). Der deutliche Einfluss von Hitzestress auf die Integrität des mitochondrialen Netzwerkes innerhalb der Zelle könnte somit auf die Schädigung von Komponenten des Zytoskeletts, beispielsweise der Intermediärfilamente, zurückzuführen sein. Diese beeinflussen neben der mitochondrialen Morphologie ebenfalls die subzelluläre Lokalisation der Mitochondrien (Schwarz & Leube, 2016).

Frühere Studien in HeLa Zellen zeigten, dass deutliche morphologische Veränderungen unter Hitzeeinfluss erst ab einer einstündigen Inkubation bei 45 °C im Lichtmikroskop beobachtet werden konnten. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass die Überlebensrate der HeLa Zellen nach einem Hitzeschock für 1 h bei 45 °C um 90 % reduziert wurde (Slater et al., 1981). In dieser Arbeit wurde für den Hitzeschock in HeLa Zellen eine zweistündige Inkubation bei 45 °C gewählt, da unter milderen Stressbedingungen keine sichtbaren Effekte in den Zellen beobachtet werden konnten. Von einer Regeneration der Zellen kann unter den angewandten letalen Bedingungen nicht ausgegangen werden. Für die Untersuchungen in isolierten Mitochondrien wurden in dieser Arbeit als Standardkondition eine weitaus kürzere Inkubation von 20 min sowie ein physiologischer Hitzestress bei 42 °C gewählt.

Der Einfluss von Hitzestress auf die funktionelle Integrität der Mitochondrien wurde anhand repräsentativer metabolischer Eigenschaften der Mitochondrien wie des mitochondrialen Innenmembranpotenzials ($\Delta\Psi$), der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) sowie der ATP-Produktion genauer untersucht. Das mitochondriale Membranpotenzial ($\Delta\Psi$) ist von entscheidender Bedeutung für die Produktion von ATP, den Import zytosolischer Proteine sowie für die Calcium-Regulation der Zelle. Es kann daher als Maß für die mitochondriale Funktion angesehen werden (Huang et al., 2003). Die hier beobachtete Abnahme des Membranpotenzials bei Hitzestress fiel in isolierten Mitochondrien stärker aus als in intakten Zellen, was auf eine höhere Temperatursensitivität der isolierten Mitochondrien schließen lässt. Dieser stärkere Effekt könnte darauf zurückzuführen sein, dass die schützende Umgebung der Organellen in der Zelle durch das Zytosol fehlt. Die hohe Konzentration von Makromolekülen im Zytosol, ein Effekt, der auch als „molecular crowding“ bezeichnet wird, kann sich positiv auf die Stabilisierung nativer Proteinkomplexe auswirken (Minton, 2000). Obgleich isolierte Mitochondrien eine hohe Temperatursensitivität aufwiesen, zeigten die weiterführenden Untersuchungen dieser Arbeit, dass die Organellen nach Hitzestress noch immer intakt waren. Dies wurde durch die Resistenz der mitochondrialen Matrixproteine gegenüber dem proteolytischen Verdau bestätigt, was den Schutz der Proteine durch eine intakte Innenmembran beweist.

Mitochondrien stellen den Hauptort der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, welche als Nebenprodukt der Atmungskette entstehen, dar (Murphy, 2009). Eine erhöhte ROS-Produktion führt zu oxidativem Stress, welcher unter anderem zu einer Inaktivierung und

Oxidation mitochondrialer Proteine führen kann (Ott et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass in hitzestressierten Zellen das oxidative Stresslevel in den Mitochondrien im Vergleich zu nicht gestressten Zellen geringer ist. Der Rückgang des oxidativen Stresses könnte durch eine verminderte Atmungsrate der Mitochondrien als Folge der erhöhten Temperatur erklärt werden, was jedoch in weiterführenden Analysen zu untersuchen ist. Frühere Studien belegten, dass in Säugetierzellen als eine der ersten Folgen von Hyperthermie der ATP-Gehalt der Zelle zurückgeht (Welch, 1992). Dies konnte hier ebenfalls auf der Ebene der Mitochondrien bestätigt werden. Mitochondrien, welche Hitzestress ausgesetzt waren, wiesen eine signifikante Verringerung des ATP-Gehalts im Vergleich zu nicht gestressten Organellen auf. Die ATP-Produktion beruht auf dem Elektronentransfer über die mitochondriale Innenmembran durch die Membran-gebundenen Komplexe I-V (Friedman & Nunnari, 2014). Die starke Verringerung der ATP-Produktion könnte durch eine hitzeinduzierte Strukturlabilität der Atmungskettenkomplexe begründet sein. In dieser Studie zeigte die Analyse der Komplexe mit Hilfe der nativen Gelelektrophorese jedoch keine signifikanten Veränderungen in der Struktur und Zusammensetzung der Atmungskettenkomplexe, was auf deren Temperaturstabilität schließen lässt. Als weitere Ursache für die Beeinträchtigung des Energiestoffwechsels wurde die Hitze-Inaktivierung wichtiger metabolischer Schlüsselenzyme des mitochondrialen Stoffwechsels untersucht. Die vorliegende Analyse belegte eine signifikante Verringerung der Aktivität des α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes (OGDC), welcher als repräsentatives Enzym des Zitratzyklus die oxidative Decarboxylierung von α -Ketoglutarat zu Succinyl-CoA katalysiert. Daraus kann geschlossen werden, dass die Hitzeinaktivierung wichtiger mitochondrialer Schlüsselenzyme eine Dysfunktion der Mitochondrien zur Folge hat. Dieses Ergebnis deckt sich mit einer Studie in dem Modellorganismus *S. cerevisiae*, in welcher ebenfalls eine deutlich verminderte α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Aktivität unter Einfluss von Hitzestress in isolierten Mitochondrien festgestellt wurde (Bender et al., 2011). Eine verringerte OGDC-Aktivität konnte zudem in den Mitochondrien des Gehirns von Alzheimer-Patienten nachgewiesen werden (Huang et al., 2003), was auf einen Einfluss der OGDC-Inaktivierung in der Ausbildung der Krankheit schließen lässt.

6.2 Hitzestabilität mitochondrialer Proteine

Nachdem im ersten Teil dieser Arbeit der generelle Effekt von Hitzestress auf die Mitochondrien dargelegt wurde, bestand das weiterführende Ziel darin, die Auswirkungen

von Hyperthermie auf das mitochondriale Proteom genauer zu bestimmen. Da erhöhte Temperaturen zu Fehlfaltungen und Aggregationen von Proteinen führen, lag der Fokus zunächst auf der Identifikation mitochondrialer Proteine, welche unter physiologischem Hitzestress eine Tendenz zur Aggregation zeigten. Aufgrund besserer Vergleichbarkeit wurde das lösliche Proteom nach Hitzestress bestimmt. Eine Reduktion des Anteils löslichen Proteins wies auf eine hitzeinduzierte Aggregation der Proteine hin, welche in weiterführenden Analysen verifiziert wurde. Die Analyse der Proteinlöslichkeit mittels Differenz-Gelelektrophorese belegte eine bemerkenswerte Hitzestabilität für den Großteil der mitochondrialen Proteine. Im Gegensatz dazu wiesen jedoch 10 Proteine konsistent eine verringerte Solubilität nach Hitzestress auf. Zwei dieser Proteine wurden als mitochondriale Matrixproteine identifiziert. Der mitochondriale Translationsfaktor Tu (Tufm) sowie die AAA+ Protease Lon (LonP1) zeigten beide eine klare temperaturabhängige Löslichkeit. Während LonP1 teilweise in der löslichen Proteinfraction nachzuweisen war, konnte lediglich eine geringe Menge lösliches Tufm nach Hitzestress detektiert werden. Die Beobachtung dieser Arbeit, dass die Proteine der Mitochondrien eine generelle Stabilität gegenüber Hitze aufweisen, deckt sich mit Untersuchungen in *S. cerevisiae*, in welchen ebenfalls bewiesen wurde, dass lediglich ein geringer Teil des mitochondrialen Proteoms unter Hitzestress aggregierte. Für das Homolog der Protease LonP1 in Hefe, Pim1, wurde dargelegt, dass dieses die Mitochondrien vor hitzebedingter Proteinaggregation schützt, indem es fehlgefaltete Polypeptide abbaut (Bender et al., 2011; Bezawork-Geleta et al., 2015). Des Weiteren wurde für Lon-Proteine sowohl eine Chaperon- als auch eine Proteaseaktivität nachgewiesen (Rep et al., 1996), welche die Assoziation von LonP1 mit fehlgefalteten Polypeptiden und die dadurch bedingte Sedimentation erklären kann. In Hefe zeigte das Homolog des mitochondrialen Translationsfaktors Tu, Tuf1, ebenfalls eine hitzebedingte Aggregation (Jaworek et al., 2018, nicht publiziert), auch wenn diese weniger stark als die hier beobachtete Aggregation in humanen Mitochondrien ausfiel. Des Weiteren wurde die Hitzeinaktivierung einzelner essenzieller Enzyme des mitochondrialen Metabolismus belegt (Bender et al., 2011). Dies unterstützt die These, dass sich die Hitzesensibilität von Zellen eher auf die Deaktivierung einzelner Enzyme mit essenziellen metabolischen Funktionen gründet (Chang et al., 2013; Leuenberger et al., 2017) als auf eine generelle Denaturierung der Proteine und den Verlust der allgemeinen Funktionen des Proteoms (Ghosh & Dill, 2010).

Die Faktoren der Thermosensibilität von Proteinen sind nicht vollständig charakterisiert, dennoch zeigte eine Proteomanalyse der temperaturbedingten Proteindenaturierung in mesophilen und thermophilen Bakterien, Hefe sowie menschlichen Zellen, dass eine umgekehrte Korrelation von Polypeptidlänge und Thermostabilität besteht sowie eine hohe Hitzestabilität von in der Zelle häufig vorkommenden Proteinen zu beobachten ist. Des Weiteren wurde postuliert, dass thermostabile Proteine reich an Lysinresten und β -Faltblatt-Strukturen sind, nicht stabile Proteine hingegen einen höheren Gehalt an Asparaginsäure aufweisen (Leuenberger et al., 2017). Letztere Beobachtung lässt sich nicht auf die Thermostabilität des mitochondrialen Elongationsfaktors Tu beziehen, dessen Aminosäuresequenz einen höheren Gehalt an Lysin als an Asparaginsäure aufweist (Ling et al., 1997).

Chrétien beschrieb erst kürzlich, dass aktive Mitochondrien in intakten Zellen bei einer konstanten Außentemperatur von 38 °C Temperaturen von bis zu 50 °C aufweisen, wenn deren Atmungskette voll funktionstüchtig ist (Chrétien et al., 2018). Dies steht im Kontrast zu der Beobachtung dieser Arbeit, dass der mitochondriale Elongationsfaktor Tu bei einer Inkubation bei 42 °C *in organello* einen fast vollständigen Verlust der Löslichkeit zeigte. Denkbar wäre jedoch, dass in den Mitochondrien lokal an der Innenmembran, dem Ort der Atmungskette, aufgrund der Energiefreisetzung bei der Oxidation von Substraten Wärme entsteht, welche sich jedoch nicht auf das gesamte Organell ausweitet. Diese partiell auftretenden hohen Temperaturen innerhalb der Mitochondrien könnten die Notwendigkeit einer generellen Hitzestabilität des mitochondrialen Proteoms erklären.

6.3 Funktionen der mitochondrialen Elongationsfaktoren

Nachdem der mitochondriale Elongationsfaktor Tu (Tufm) als hitzelabiles Protein identifiziert wurde, stand eine genauere Untersuchung des Aggregationsverhaltens dieses Proteins im Fokus der Arbeit. Darüber hinaus wurde die hitzebedingte Aggregation des mitochondrialen Elongationsfaktors Ts (Tsfm) untersucht, welcher als Interaktionspartner und Nukleotidaustauschfaktor von Tufm im Prozess der Elongation fungiert (Cai et al., 2000).

Die Nomenklatur der prokaryotischen Elongationsfaktoren (EF-Tu bzw. EF-Ts) erfolgte zum Zeitpunkt ihrer Identifizierung basierend auf Untersuchungen in Bakterien, in welchen die Transferfaktoren (T) aufgrund ihrer Thermostabilität *in vitro* als nicht stabil

(engl.: unstable, u; Tu) und stabil (engl.: stable, s; Ts) bezeichnet wurden (Fu et al., 2012; Lucas-Lenard, 1971). Spätere *in vitro* Studien in *E. coli* zeigten jedoch, dass EF-Tu ebenfalls eine erhöhte Thermostabilität bis 50 °C zeigte, wenn dieser in einem Komplex mit EF-Ts, GDP, GTP oder Aminoacyl-tRNA und GTP vorlag (Arai et al., 1974). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit, welche unter *in vivo* ähnlichen Bedingungen in intakten Mitochondrien durchgeführt wurde, konnte bewiesen werden, dass Tsfm bei erhöhten Temperaturen ebenfalls nicht stabil ist und ein vergleichbares Aggregationsverhalten wie Tufm aufweist. Die Nomenklatur ist somit nicht konsistent mit der Thermostabilität der Elongationsfaktoren in Säugetiermitochondrien.

Während die Translationsfaktoren Ts nur zu einem geringen Teil konserviert vorliegen, sind die Proteine der EF-Tu Familie eine Gruppe hoch konservierter Proteine, welche in Bakterien, Chloroplasten, Mitochondrien sowie im eukaryotischen Zytoplasma zu finden sind. Hierbei besitzt Tufm in Säugetiermitochondrien eine höhere Aminosäuresequenzähnlichkeit mit dem bakteriellen EF-Tu als mit dem humanen Elongationsfaktor 1 α im Zytosol (EF-1 α), was auf den endosymbiontischen Ursprung der Mitochondrien zurückzuführen ist (Ling et al., 1997).

Zusätzlich zu der Hauptfunktion des Elongationsfaktors Tu im Prozess der Translation wurden verschiedene andere Funktionen beschrieben. *In vitro* Studien in Säugetiermitochondrien zeigten eine Chaperonaktivität des mitochondrialen Elongationsfaktors Tufm (Suzuki et al., 2007), welche ebenfalls für EF-Tu in Bakterien (Caldas et al., 1998; Kudlicki et al., 1997) und in Chloroplasten (Rao et al., 2004; Ristic et al., 2008) belegt wurde. Die mögliche Prävention einer hitzebedingten Proteinaggregation durch EF-Tu wurde zudem mit der Hitzetoleranz von Pflanzen in Verbindung gebracht (Bhadula et al., 2001). Es wurde beschrieben, dass Hitzestress sowie weitere abiotische Stressfaktoren wie Salz, Wasserknappheit und Hypothermie eine Hochregulation der Genexpression von EF-Tu in Plastiden sowie EF-1 α im Zytosol auslöste (Fu et al., 2012). Sowohl für den mitochondrialen Elongationsfaktor Tufm (Suzuki et al., 2007) als auch für das zytosolische EF-1 α (Hotokezaka et al., 2002) wurde die Interaktion mit neu synthetisierten, naszierenden Polypeptidketten gezeigt. Des Weiteren wurde EF-Tu als wirtsspezifische Untereinheit des Replikationskomplexes von Bakteriophagen Q β beschrieben (Blumenthal et al., 1972). *In vitro* Studien in Bakterien belegten zudem eine Protein-Disulfid-Isomeraseaktivität für EF-Tu (Richarme, 1998). Für den zytosolischen Elongationsfaktor EF-1 α wurde darüberhinaus die Interaktion mit Aktin *in vivo* dargelegt,

welche eine wichtige Rolle in der Regulation des Zytoskeletts spielt (Gross & Kinzy, 2005).

Obgleich in der vorliegenden Arbeit keine Chaperon-Aktivität des mitochondrialen Elongationsfaktors nachgewiesen werden konnte, stimmen die Ergebnisse mit der Annahme, dass der Elongationsfaktor Tu einen bedeutenden Einfluss auf die Proteinqualitätskontrolle unter Stressbedingungen hat, wie dies in Pflanzen, Bakterien und Säugetieren bewiesen wurde, überein.

6.3.1 Effekte von Tufm- und Tsfm-Mutationen auf die Mitochondrienfunktion

Beim Menschen sind für die mitochondrialen Elongationsfaktoren Tufm und Tsfm letale Missense-Mutationen beschrieben, welche einen Defekt in der mitochondrialen Proteinbiosynthese sowie eine verminderte oxidative Phosphorylierung aufwiesen. Eine Mutation in Tsfm, welche die Fähigkeit Tufm zu binden verringerte (Akama et al., 2010), resultierte in einer mitochondrialen Enzephalopathie bei einem Patienten sowie einer hypertrophen Kardiomyopathie bei einem anderen Patienten (Smeitink et al., 2006). Eine Mutation in Tufm wurde bei einem Säugling diagnostiziert, welcher an Laktatazidose und Enzephalopathie mit zystischer Leukodystrophie litt (Valente et al., 2007). Für das mutierte Tufm wurde belegt, dass es nicht in der Lage ist Aminoacyl-tRNA zu binden und einen ternären Komplex zu bilden (Akama et al., 2010). Dies verdeutlicht, dass die Elongationsfaktoren essenziell für die Funktionalität der Mitochondrien und somit für den gesamten Organismus sind.

6.4 Nukleotid-unabhängige Aggregation unter verschiedenen Stressbedingungen

Zur Charakterisierung des Aggregationsverhaltens mitochondrialer Proteine wurde neben den Elongationsfaktoren Tufm und Tsfm ebenfalls die Hitzesensitivität weiterer Proteine untersucht. Das Enzym des Zitratzyklus Aconitase (Aco2), welches bereits in früheren Studien als ein metastabiles Protein identifiziert wurde (Bender et al., 2011; Bota & Davies, 2002), sowie das Matrixchaperon Hsp60 zeigten eine distinkte Aggregationstendenz, welche weniger stark als bei den Elongationsfaktoren ausfiel, sodass der Großteil des jeweiligen Proteins auch nach starkem Hitzestress löslich war. Des Weiteren wurde das mitochondriale Ribosomprotein Mrpl38 als Kontrollprotein untersucht. Dieses wies zusätzlich zu der temperaturunabhängigen Sedimentation

ebenfalls eine temperaturabhängige Aggregation auf. Die von dem Einfluss hoher Temperatur unabhängige Sedimentation kann mit der Assoziation von Mrpl38 und dem makromolekularen Ribosomkomplex in Verbindung gebracht werden. Das unterschiedliche Sedimentationsverhalten von Mrpl38 und Tufm zeigte deutlich, dass die temperaturabhängige Aggregation von Tufm nicht auf der Ko-Sedimentation mit dem Ribosom basiert. Darüber hinaus wurde belegt, dass Mrpl38 und Tufm nicht über ionische Bindungen miteinander verknüpft sind. Es konnte zudem verifiziert werden, dass die Verringerung von löslichem Tufm nicht auf eine proteolytische Degradation des Proteins, sondern auf eine fast vollständige, stressbedingte Aggregation zurückzuführen ist.

Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) stellt einen wichtigen Stressfaktor für Mitochondrien dar (Ott et al., 2007). Besonders im Verlauf der Seneszenz kommt es in Mitochondrien zu einer verstärkten ROS-Produktion (Balaban et al., 2005). Die Folge sind dysfunktionale Mitochondrien, welche mit der Ausbildung verschiedener altersassoziierten Krankheiten, wie Morbus Alzheimer, in Verbindung stehen (Anderson et al., 1981; Lin & Beal, 2006; Neupert, 2015). In dieser Studie konnte eine signifikante Verringerung der Tufm-Löslichkeit unter dem Einfluss von oxidativem Stress bewiesen werden, obgleich diese weniger stark als unter Hyperthermie ausfiel. Es stellt sich daher die Frage, ob eine Aggregation von Tufm als Folge eines erhöhten oxidativen Stresslevels die mitochondriale Translation in alternden Zellen beeinflusst. Der Einfluss von oxidativem Stress auf die mitochondriale Translation ist in weiterführenden Untersuchungen zu überprüfen.

Die mitochondriale Proteinhomöostase wird unter physiologischen und leichten Stresssituationen durch die Aktivität des Proteinqualitätskontrollsystems erhalten. Als Teil dieses Systems vermitteln Chaperone, welche für ihre Aktivität Energie in Form von ATP benötigen, die korrekte Faltung von Polypeptiden und verhindern so deren Aggregation (Voos, 2013). In dieser Studie konnte keine ATP-Abhängigkeit der Aggregation der mitochondrialen Elongationsfaktoren beobachtet werden. Daraus kann geschlossen werden, dass die temperaturbedingte Aggregation dieser Proteine nicht durch Chaperone verhindert wird. Dies kann darauf hindeuten, dass die Elongationsfaktoren keine Substrate des Proteinqualitätskontrollsystems darstellen. Des Weiteren kann es ein Hinweis darauf sein, dass eine Überlastung des mitochondrialen Proteinqualitätskontrollsystems aufgrund fehlgefalteter Proteine während der Stresssituation vorliegt. Dabei ist darauf hinzuweisen,

dass die Analyse in isolierten Mitochondrien durchgeführt wurde und daher die Mitochondrien-spezifische Stressantwort (UPR^{mt}) nicht mit einbezogen wurde. Bei diesem retrograden Signalweg der Mitochondrien zum Zellkern wird als Folge der stressbedingten Anhäufung fehlgefalteter Polypeptide in der Matrix, die Transkription mitochondrialer Hitzeschockproteine und Proteasen im Zellkern aktiviert (Quiros et al., 2016). Durch die verstärkte Expression der Komponenten des Proteinqualitätskontrollsystems kann die Proteinhomöostase in den Mitochondrien wiederhergestellt werden. In isolierten Mitochondrien können die hitzebedingten Schäden des mitochondrialen Proteoms jedoch nicht durch eine verstärkte nukleäre Expression kompensiert werden. Dies führt zu einer schnelleren Überlastung des mitochondrialen Proteinqualitätskontrollsystems und folglich zu einer stärkeren Akkumulation von Aggregaten, während der Aggregationsprozess in intakten Zellen durch die UPR^{mt} kompensiert werden kann. Dies zeigt die Analyse des Aggregationsprozesses mitochondrialer Proteine in intakten Zellen, bei welcher die Aggregation sowohl unter hitzebedingtem als auch unter oxidativem Stress weniger stark als in isolierten Mitochondrien ausfällt. Die Nukleotidabhängigkeit der Aggregation wurde zudem in Anwesenheit von GTP getestet, da der Elongationsfaktor Tu zur Übertragung der Aminoacyl-tRNA an die A-Stelle des Ribosoms GTP als Energiequelle benötigt. Nach erfolgreichem Transfer des Aminosäurerests wird GDP-gebundenes Tufm entlassen und der Austausch zu GTP durch den Elongationsfaktor Ts vermittelt (Cai et al., 2000). Die in früheren Studien postulierte erhöhte Thermostabilität des bakteriellen EF-Tu, wenn dieser in der GTP gebundenen Form vorlag (Arai et al., 1974), konnte hier nicht bestätigt werden, da kein Einfluss der GTP-Konzentration auf die Hitzestabilität von Tufm unter Hitzeschockbedingungen beobachtet werden konnte.

Innerhalb dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Löslichkeit hitzeinduzierter Proteinaggregate in isolierten Mitochondrien nach dem Abklingen der Stresssituation nicht wiederhergestellt werden konnte. Dies lässt vermuten, dass in Säugetiermitochondrien keine Chaperone-abhängige Disaggregation fehlgefalteter Proteine existiert. Obgleich in früheren Studien in Hefemitochondrien eine Disaggregationsaktivität *in vivo* belegt werden konnte (Germaniuk et al., 2002; Röttgers et al., 2002), zeigte sich eine Disaggregationsaktivität in Säugetiermitochondrien lediglich unter *in vitro* Bedingungen (Nillegoda & Bukau, 2015; Rampelt et al., 2012) und konnte nicht direkt in Säugetierzellen bestätigt werden. Es ist daher möglich, dass in Säugetiermitochondrien keine Chaperon-abhängige Disaggregation fehlgefalteter

Polypeptide erfolgt. Im Gegensatz zu den Mitochondrien der Säugetiere besitzen Hefen das mitochondriale Chaperon Hsp78, welches in der Lage ist, fehlgefaltete Polypeptide zu disaggregieren und somit entweder die Rückfaltung in ihre native Form oder deren Degradation zu vermitteln (Röttgers et al., 2002). Dies wirft die Frage auf, wie das Proteinqualitätskontrollsystem in Säugetieren auch ohne eine Disaggregationsaktivität auskommt. Zum einen sind Säugetiere in der Lage durch ihre Fähigkeit der Mobilität Stresssituationen wie erhöhte Temperaturen auszuweichen und außerdem ihre Körpertemperatur in einem gewissen Maß unabhängig von der Außentemperatur konstant zu halten. Zum anderen handelt es sich bei höheren Eukaryoten um Vielzeller, welche zum Vorteil des gesamten Organismus terminal geschädigte Zellen abbauen können. Kommt es zu Anhäufungen von Proteinaggregaten in den Mitochondrien von Säugetierzellen, so können defekte Mitochondrien mittels Mitophagie degradiert werden. Sind die Schäden jedoch zu schwerwiegend, kann als nächster Schritt die gesamte Zelle durch Apoptose abgebaut werden. Auch wenn dieser Mechanismus ebenfalls für Einzeller wie Hefe beschrieben ist (Wloch-Salamon & Bem, 2013), stellt jedoch die Bewältigung von proteotoxischem Stress die Voraussetzung für das Überleben einzelliger Organismen dar. Zu untersuchen bleibt, ob die durch Hitzestress geschädigten Polypeptide in Säugetiermitochondrien in Proteinaggregatkompartimenten abgelagert werden. Dieser Schutzmechanismus der Mitochondrien vor potenziell toxischen Proteinaggregaten wurde bereits für hitzelabile Proteine in Hefe gezeigt, welche in sogenannten IMiQ-Kompartimente abgelagert werden (Bruderek et al., 2018).

6.5 Inhibition der mitochondrialen Translation nach Hitzestress

Die beobachtete Aggregation der für die Translation essenziellen Elongationsfaktoren in den Mitochondrien warf die Frage auf, inwieweit die mitochondriale Proteinbiosynthese unter dem Einfluss von Hitzestress beeinflusst ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Synthese mitochondrial kodierter Proteine mit anhaltendem Hitzestress zum Erliegen kommt. Der zeitliche Verlauf der Abnahme der Translationseffizienz ähnelt hierbei der Kinetik der Aggregation von Tufm und Tsfm. Dies kann darauf hinweisen, dass die verringerte Löslichkeit der Elongationsfaktoren bei Hyperthermie den Rückgang der Translationsrate bedingt. Die thermolabilen Elongationsfaktoren könnten somit als Sensoren dienen, welche unter Stressbedingungen schnell die Neusynthese von Polypeptiden in Mitochondrien herunterfahren, um eine Überlastung der Mitochondrien durch fehlgefaltete Polypeptide zu verhindern.

Neu synthetisierte Polypeptide besitzen aufgrund ihrer unvollständigen Faltung eine höhere Sensitivität gegenüber Hitzestress als vollständig gefaltete, reife Proteine, was häufig zu ihrer Ubiquitin-abhängigen Degradation führt (Medicherla & Goldberg, 2008). Ein Stopp der Proteinbiosynthese unter Stressbedingungen kann daher für die Zelle von Vorteil sein, um die Menge an potenziell aggregierenden Proteinen zu begrenzen. Eine solche Hitzestress-induzierte Inhibition der Proteinbiosynthese wurde, mit Ausnahme von Hitzeschockproteinen, bereits für zytosolisch synthetisierte Proteine in HeLa Zellen gezeigt. Die Hemmung findet hierbei ebenfalls auf der Ebene der Translation statt und erfolgt über die Phosphorylierung des Translationsinitiationsfaktors eIF2 α (Duncan & Hershey, 1984). In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass, ebenso wie im Zytosol, die Translation in den Mitochondrien unter dem Einfluss von Hitzestress gehemmt ist. Obwohl der genaue Mechanismus der mitochondrialen Translationsinhibition in dieser Arbeit nicht vollständig beschrieben wurde, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Regulation auf der Ebene der Elongation durch die stressbedingte Aggregation und der damit verbundenen Inaktivierung der mitochondrialen Elongationsfaktoren erfolgt.

Als weiterer Mechanismus eukaryotischer Zellen, um das Proteinqualitätskontrollsystem unter Hitzestress nicht mit neu synthetisierten Polypeptiden zu überlasten, wurde zudem die Bildung sogenannter Stress-Granules im Zytosol beschrieben (Buchan & Parker, 2009; Cherkasov et al., 2013). Dieser regulierte und reversible Prozess der Aggregatbildung als Kontrollmechanismus der Translation unter Stresseinfluss, ermöglicht den Stopp der Translation nicht essenzieller Proteine, um somit die Synthese zytoprotektiver Proteine zu begünstigen. Die Bildung von Stress-Granules wird durch die stressbedingte Phosphorylierung des Translationsinitiators eIF2 α induziert, welche die Translation stoppt und die Freilassung der Translationsfaktoren und der mRNA vom Ribosom bedingt (Buchan & Parker, 2009). Bei der Bildung der Stress-Granules wird eine gezielte Aggregation von mRNAs durch RNA-bindende Proteine vermittelt. Diese Proteine besitzen Glycin-reiche, hydrophobe Domänen, welche für die reversible Aggregation der Proteine unter Stress verantwortlich sind (Wolozin, 2012). Es wurde gezeigt, dass sich Stress-Granules bereits innerhalb von Minuten bilden und nach kurzer Zeit wieder disassemblieren, wenn sich die Zelle von dem Stresseinfluss erholt hat (Kedersha et al., 1999). In Mitochondrien ist ebenfalls die Bildung von RNA-Granules durch RNA-bindende Proteine zur Koordination und Lagerung posttranskriptionaler, mitochondrialer RNAs beschrieben (Antonicka et al., 2013). Jedoch ist keine stressbedingte Bildung von

Stress-Granules zur Translationskontrolle, welche vergleichbar mit dem zytosolischen Mechanismus ist, bekannt. Ob es sich bei der Aggregation der Elongationsfaktoren um einen ähnlichen Mechanismus wie bei der Stress-Granules-Bildung handelt, obliegt weiteren Untersuchungen. Ein erster Ansatz zur Überprüfung könnte eine Ko-Aggregation von RNA-Molekülen und den Translationsfaktoren unter Hitzestress sein.

Das Konzept der positiven Auswirkungen von Proteinefehlfaltungen wurde bereits für das Prion Sup35, einem Translationsterminator in Hefe, beschrieben. Prione sind Proteine, welche neben ihrer funktionellen, löslichen ebenfalls eine pathogene Konformation einnehmen können. Prione stellen selbst replizierende Proteine dar, welche zur Bildung amyloider Aggregate neigen (Garcia & Jarosz, 2014). Sup35 besitzt, ähnlich wie RNA-bindende Proteine, eine hydrophobe Domäne, welche aus polaren Aminosäuren besteht. Es wurde gezeigt, dass die Instabilität der Prion-Domäne als Folge von Stress zu der Bildung eines reversiblen, membranfreien Kompartiments führt. Dieses besteht aus Sup35 Kondensaten, deren Funktion als Translationsterminationsfaktor nach Abklingen der Stresssituation wieder regeneriert werden kann (Franzmann & Jahnel, 2018). Diese Beobachtung wurde erst vor kurzem beschrieben und stellt ein weiteres Beispiel für einen Protein-spezifischen Stresssensor dar, welcher eine schnelle Reaktion der Zelle auf sich ändernde Umgebungsbedingungen ermöglicht. Ob ein ähnlicher Mechanismus bei der hier beobachteten hitzebedingten Aggregation der mitochondrialen Translationsfaktoren zugrunde liegt, bleibt noch weiterführend zu untersuchen. Obwohl für Tufm eine starke Strukturlabilität unter dem Einfluss von Hitzestress bewiesen werden konnte, geben die Ergebnisse dieser Arbeit keinen Hinweis auf die Bildung reversibler Kompartimente in den Mitochondrien. Weder zeigten die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen die Bildung von Kondensaten noch konnte eine Solubilisation von Tufm nach einer Regenerationszeit festgestellt werden. Zudem konnte keine Wiederherstellung der mitochondrialen Translation bestätigt werden, wie dies für die Translation im Zytosol nach einer Erholungsphase im Anschluss an die Stresssituation beschrieben wurde (Duncan & Hershey, 1984). Zu beachten bleibt hierbei, dass es sich, wie zuvor um eine *in organello* Analyse handelte, bei welcher die Hitzeschockantwort der Zelle und die damit verbundene veränderte Proteinexpression nukleär kodierter Proteine keinen Einfluss hat. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass ein unter *in vivo* Bedingungen erhöhtes Vorkommen von Chaperonen in den Mitochondrien die Translationseffizienz nach Hitzeschock wiederherstellen könnte.

Die Frage, ob der Rückgang der Translation nach Hitzestress ebenfalls durch eine fehlerhafte Assemblierung der Mitribosomen aufgrund der Aggregation ribosomaler Proteine begründet werden könnte, wie dies bereits für ribosomale Proteine im Nukleus nach Hitzeschock beschrieben wurde (Welch & Suhan, 1985), ist in kommenden Untersuchungen noch zu beantworten.

Eine Besonderheit des mitochondrialen Proteoms stellt die Proteinbiosynthese in unterschiedlichen Zellkompartimenten dar. Nur ein Bruchteil der mitochondrialen Proteine ist auf der mitochondrialen DNA kodiert und wird an Mitribosomen synthetisiert. Der Großteil der mitochondrialen Proteine jedoch liegt im Nukleus kodiert vor und wird nach der Synthese an zytosolischen Ribosomen in die Mitochondrien importiert (Chacinska et al., 2009). Aus diesem Grund verhindert das einseitige Herunterschalten der mitochondrialen Translation lediglich die Akkumulation fehlgefalteter, mitochondrial synthetisierter Polypeptide. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter *in organello* Bedingungen zusätzlich zum Herunterschalten der Translation die Importeffizienz zytosolisch synthetisierter Proteine nach Hitzestress stark herunterreguliert ist. Eine Ursache für den Rückgang der Importeffizienz kann die gemessene Verringerung des mitochondrialen Membranpotenzials sein, welches für den Proteinimport essenziell ist und mit steigender Temperatur in isolierten Mitochondrien stark zurückging. Des Weiteren kann die Importaktivität in Stresssituationen durch eine Beeinträchtigung der Atmungskettenaktivität, eine Reduktion des ATP-Levels sowie eine verstärkte Auslastung des Chaperons Mortalin durch fehlgefaltete Proteine beeinflusst sein. Die Importaktivität stellt somit einen sensitiven Sensor für die Fitness der Mitochondrien dar (Harbauer et al., 2014).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass frisch importierte Proteine anfälliger für eine hitzebedingte Aggregation sind als endogene, reife Proteine. Diese Anfälligkeit für eine Fehlfaltung unter Stressbedingungen lässt sich darauf zurückführen, dass zytosolische Proteine für den Import in die Mitochondrien in ihrer ungefalteten Form vorliegen und erst in der mitochondrialen Matrix mit Hilfe von Chaperonen in ihre native Form zurückgefaltet werden. Ein Stopp des Imports könnte daher einen zusätzlichen Schutz der Mitochondrien vor der Überlastung des Proteinqualitätskontrollsystems mit aggregationsanfälligen Polypeptiden darstellen.

Im zellulären Kontext hat die Beeinträchtigung des mitochondrialen Imports nicht nur Folgen für die Proteinhomöostase in den Mitochondrien, sondern führt ebenfalls zu einer

Ansammlung von Präproteinen im Zytosol. Studien belegen, dass Präproteine, welche aufgrund mitochondrialer Dysfunktion nicht importiert werden, die Assemblierung und Aktivität des Proteasoms verstärken (Wrobel et al., 2015). Dieser Prozess, der als UPR^{am} (engl.: unfolded protein response by mistargeted proteins) bezeichnet wird, steigert die Kapazität der Proteindegradation im Zytosol und ermöglicht die Aufrechterhaltung der zellulären Proteinhomöostase bei mitochondrialem Stress (Topf et al., 2016).

Innerhalb dieser Arbeit wurden die Auswirkungen von Stress auf das Proteom und die Proteinbiogenese der Mitochondrien untersucht. Es wurde beschrieben, dass Hitzestress nicht zu einer großflächigen Aggregation mitochondrialer Proteine führt. Vielmehr konnte die Aggregation weniger Proteine beobachtet werden. Eine signifikante Thermolabilität zeigten die mitochondrialen Elongationsfaktoren, welche eine Schlüsselfunktion in der mitochondrialen Proteinbiosynthese besitzen. Dieses Ergebnis identifiziert erstmalig aggregationsanfällige endogene Proteine in Säugetiermitochondrien und die Auswirkungen von Hitzestress auf die Proteinbiogenese der Mitochondrien. Es wurde nachgewiesen, dass sowohl die mitochondriale Translation als auch der Proteinimport unter dem Einfluss von Hitzestress zum Erliegen kommt. Da neu synthetisierte sowie frisch importierte Polypeptide eine erhöhte Aggregationstendenz unter Stressbedingungen besitzen, stellt der Stopp der Proteinbiogenese der Mitochondrien einen weiteren Schutzmechanismus der Mitochondrien vor proteotoxischem Stress dar.

6.6 Modell des mitochondrialen Schutzmechanismus vor Proteotoxizität

Die vorliegenden Analysen weisen auf einen Mechanismus hin, der zum Erhalt der Proteinhomöostase in Mitochondrien in Stresssituationen beiträgt. Die mitochondriale Proteostase wird unter physiologischen und Stressbedingungen durch die Aktivität des Proteinqualitätskontrollsystems erhalten. Ist dieses überlastet, kommt es zu einer Akkumulation fehlgefalteter Polypeptide. Nach dem hier beschriebenen Mechanismus kann die Anhäufung weiterer ungefalteter Polypeptide durch einen Stopp der Translation sowie des Proteinimports verhindert werden (Abb. 30). Dies dient als Schutzmechanismus der Mitochondrien, da die Anwesenheit großer Mengen ungefalteter Polypeptidketten das bereits ausgelastete Proteinqualitätskontrollsystem überfordern würde und so zu weiteren Polypeptidfehlfaltungen führen könnte. Die Beobachtungen dieser Arbeit unterstützen zudem die Annahme, dass die mitochondrialen Elongationsfaktoren Tufm und Tsfm eine wichtige Rolle in diesem Schutzmechanismus der Mitochondrien vor proteotoxischem Stress darstellen. Als essenzielle Faktoren der mitochondrialen Translation können diese durch ihre hitzebedingte Aggregation und dem damit einhergehenden Funktionsverlust als Sensoren dienen, um temperaturabhängig die Proteinbiosynthese in den Mitochondrien zum Erliegen zu bringen. Nach dem Abklingen der Stresssituation ist eine Erholung in Form der Aufnahme der mitochondrialen Translation sowie des Proteinimports wieder möglich und die gebildeten Proteinaggregate können mittels proteolytischen Abbaus beseitigt werden. Es ist denkbar, dass die Elongationsfaktoren unter physiologischen Bedingungen ständig produziert und importiert werden. Tritt eine Stresssituation auf, wird die Funktion der Elongationsfaktoren inhibiert. Dies erfolgt zum einen durch die stressbedingte Aggregation und zum anderen durch einen Stopp des Imports aus dem Zytosol. Nach der Stresssituation können lösliches, funktionstüchtiges Tufm und Tsfm wieder in die Mitochondrien importiert und die mitochondriale Proteinsynthese wieder aufgenommen werden.

Auch wenn der Mechanismus der stressbedingten Inhibition der mitochondrialen Proteinbiogenese in der vorliegenden Studie nicht vollumfänglich untersucht wurde, könnte der daraus resultierende Schutz des Proteoms eine wichtige Rolle spielen. So lässt sich zusammenfassen, dass dieser Mechanismus einen effizienten Weg zur Verhinderung

der Akkumulation geschädigter Proteine innerhalb der Mitochondrien darstellt, den Erhalt der mitochondrialen Qualität und Funktionalität gewährleistet.

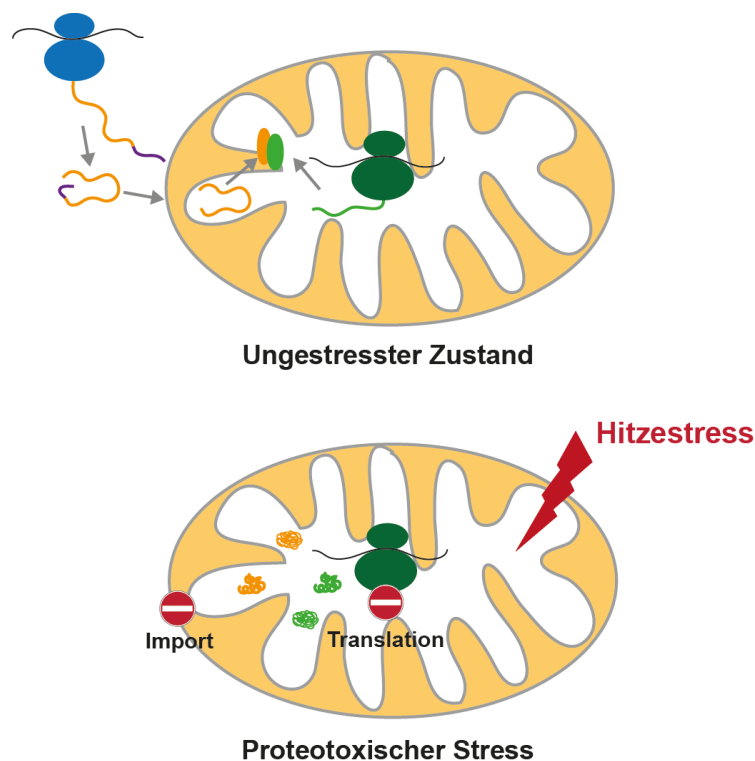


Abbildung 30: Modell des Schutzmechanismus der Mitochondrien bei proteotoxischem Stress. Die Proteinbiogenese in Mitochondrien erfolgt zum einen über den Import zytosolisch synthetisierter Proteine und zum anderen über die Translation mitochondrial kodierter Proteine in der Matrix. Die nukleär und mitochondrial kodierten Proteinuntereinheiten werden in den Mitochondrien zu den Atmungskettenkomplexen assembliert. Unter dem Einfluss von Hitzestress kommt es zu Proteinefehlfaltungen und -aggregationen. Als Folge werden die mitochondriale Translation sowie der Import gestoppt. Dies beugt weiteren proteotoxischen Stress durch die Ansammlung fehlgefalteter und aggregierter Polypeptide vor.

6.7 Offene Fragen und Ausblick

Das in dieser Arbeit aufgestellte Modell des Schutzmechanismus der Mitochondrien vor proteotoxischem Stress durch die Aggregation der mitochondrialen Elongationsfaktoren bietet eine wichtige Grundlage für künftige Forschungen. Aufbauend auf den vorliegenden Ergebnissen ist der Frage nachzugehen, ob die hitzebedingte Aggregation der Elongationsfaktoren die einzige Ursache für den Rückgang der mitochondrialen Translation ist oder ob weitere stressbedingte Defekte wie eine fehlerhafte Assemblierung des mitochondrialen Ribosoms ebenfalls zu diesem Effekt beitragen. Darüber hinaus wird zu untersuchen sein, ob die Aggregate der hitzelabilen Elongationsfaktoren nach der Stresssituation abgebaut oder zum Schutz der mitochondrialen Proteinhomöostase in spezielle Kompartimente sequestriert werden. Da die Analyse der Import- und Translationseffizienz in dieser Studie in isolierten Mitochondrien durchgeführt wurde, ist als nächster Schritt die Charakterisierung der stressbedingten Inhibition der mitochondrialen Proteinbiosynthese sowie des Proteinimports in die Mitochondrien in intakten Zellen durchzuführen, um eine mögliche Kompensation der Zelle durch eine erhöhte Proteinexpression nukleär kodierter Proteine näher zu untersuchen. Des Weiteren stellt die Untersuchung der Auswirkungen weiterer Stresssituationen, wie zum Beispiel des oxidativen Stresses auf die mitochondriale Proteinbiogenese, einen wichtigen Aspekt zukünftiger Forschung dar.

Da Defekte in der mitochondrialen Funktion mit einer Reihe neurodegenerativer Erkrankungen in Verbindung gebracht werden, schließen sich dieser Arbeit krankheitsrelevante Fragen an, welche sich mit der Rolle mitochondrialer Proteinaggregationen in der Ausbildung dieser Pathologien beschäftigen. Der Erhalt der mitochondrialen Funktionalität unter proteotoxischem Stress könnte von entscheidender Bedeutung bei der Ausbildung dieser Krankheiten sein. Das Wissen um den Mechanismus der Mitochondrien, sich unter Stressbedingungen vor erhöhter Akkumulation von Proteinaggregaten zu schützen, kann somit ein wichtiger Aspekt in der Forschung neurodegenerativer Krankheiten sein.

7 Abkürzungsverzeichnis

μ	Micro (10^6)
μM	Micromolar
$\Delta\psi$	Mitochondriales Membranpotenzial
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
$[\text{}^{35}\text{S}]$	Schwefelisotop 35
A	Amper
Abb.	Abbildung
Aco2	Aconitase 2
ADP	Adenosindiphosphat
AMM	Äußere Mitochondrienmembran
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATFS-1	Engl.: Activating transcription factor associated with stress 1
Atg	Engl.: Autophagy related proteins
ATP	Adenosinetriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
AVO	Antimycin A Valinomycin Oligomycin
BN	Blue native
BSA	Engl.: Bovine serum albumin
CCD	Engl.: Charge Coupled Device
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CHAPS	Engl.: 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate
Chx	Cycloheximid
Clp	Caseinolytische Peptidase
COX	Cytochrom-c-Oxidase
Cox4	Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 4
DAPI	4'-6-Diamidino-2-Phenylidol
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DIGE	Differenz-Gelelektrophorese
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Engl.: Deoxyribonucleic acid

DNAJA3	DnaJ homolog subfamily A member 3
DTT	Dithioreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylenediamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatische Retikulum
et al.	Lat.: et alii
EtOH	Ethanol
F1 β	ATP-Synthase Untereinheit β
FKS	Fetales Kälberserum
FL	Engl.: Full-length
g	Zentrifugalkraft
GDP	Guanindiphosphat
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
G-Protein	Guanintriphosphat bindendes Protein
GRPEL2	Engl.: GrpE protein homolog 2
GTP	Guanintriphosphat
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HSR	Engl.: Heat shock response
Hsp	Hitzeschockprotein (engl.: heat shock protein)
Hsp60	Engl.: 60 kDa heat shock protein
HSF1	Hitzeschockfaktor 1
Ig	Immunoglobulin
IMiQ	Engl.: Intra-mitochondrial quality compartment
IMM	Innere Mitochondrienmembran
IMR	Intramembranraum
INQ	Engl.: Intranuclear quality compartment
IPOD	Engl.: Insoluble protein deposit
IPDG	Isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani

LC-MS	Engl.: Liquid Chromatography mass spectrometry
Lon	Mitochondriales Lon Protease Homolog
Lys	Lysine
m	Milli (10^{-3})
M	Molar
Mdh2	Malatdehydrogenase 2
Met	Methionin
Mge1	Mitochondriales GrpE1
MIA	Engl.: Mitochondrial intermembrane space assembly
min	Minute
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
Mpp	Engl.: Matrix processing peptidase
M_r	Relative Molekülmasse
mRNA	Engl.: Messenger ribonucleic acid
Mrpl38	Mitochondriales 39S Ribosomprotein L38
MS	Massenspektrometrie
MTOC	Engl.: Microtubule-organizing centre
MTS	Engl.: Mitochondria Tagreting Signal
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
Ndufa9	NADH Dehydrogenase 1 α -Komplex Untereinheit 9
N-terminus	Amino-terminus
nm	Nanometer
n	Nano (10^{-9})
O_2^-	Hydroxid-Anion
OGDC	α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex
Oxa1	Engl.: Oxidase assembly 1
PAM	Engl.: ATP-driven presequence translocase-associated motor
PAGE	Engl.: Polyacrylamide gel electrophoresis
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pH	Lat.: Pondus Hydrogenii
PK	Proteinase K
PQC	Engl.: Protein quality control

RNA	Engl.: Ribonucleic acid
rRNA	Engl.: Ribosomal ribonucleic acid
ROS	Engl.: Reactive oxygen species
SAM	Engl.: Sorting and assembly machinery
SdhA	Engl.: flavoprotein subunit of the succinate dehydrogenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standard error of the mean
siRNA	small interfering RNA
Sod2	Mitochondriale Superoxid-Dismutase
SU9	Engl.: Subunit 9 of mitochondrial ATPase
TBS	Engl.: Tris buffered saline
TCA	Engl.: Trichloroacetic acid
TIM	Engl.: Translocase of the inner membrane
TMRE	Tetramethylrhodaminethylester
TOM	Engl.: Translocase of the outer membrane
Trap1	Engl.: Tumor necrosis factor receptor-associated protein 1
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Engl.: Transfer ribonucleic acid
Tsfm	Mitochondriale Elongationsfaktor Ts
Tufm	Mitochondriale Elongationsfaktor Tu
UPR	Engl.: Unfolded protein response
UPR ^{mt}	Engl.: mitochondrial UPR
Uqcrc2	Cytochrome b-c1 Komplex Untereinheit 2
V	Volt
Vdac	Engl.: Voltage-dependent anion-selective channel protein 1
v/v	Engl.: Volume per volume
w/v	Engl.: Weight per volume

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die mitochondriale Proteinbiogenese	7
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Auswirkungen von Stress auf mitochondriale Proteine sowie das Proteinqualitätsnetzwerk in Mitochondrien	11
Abbildung 3: Fluoreszenzmikroskopische Analyse mitochondrialer Proteine in HeLa Zellen nach Hitzestress	41
Abbildung 4: Messung des mitochondrialen Membranpotenzials in intakten HeLa Zellen	42
Abbildung 5: Messung der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in intakten HeLa Zellen	43
Abbildung 6: Messung des mitochondrialen Membranpotenzials in isolierten Mitochondrien	44
Abbildung 7: Messung des ATP-Gehalts in isolierten Mitochondrien	45
Abbildung 8: Integrität isolierter Mitochondrien nach Hitzestress	46
Abbildung 9: Analyse der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe nach Hitzestress ..	47
Abbildung 10: Aktivität von Enzymen des Zitratzyklus nach Hitzeschock	48
Abbildung 11: Zweidimensionale Differenz-Gelelektrophorese mitochondrialer Proteine	50
Abbildung 12: Identifizierte mitochondriale Proteine mittels Differenz-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie	52
Abbildung 13: Quantitative Analyse löslicher Proteine nach Hitzeschock im Vergleich zur Kontrollprobe	54
Abbildung 14: Proteinaggregation in isolierten Mitochondrien bei Hitzestress	56
Abbildung 15: Proteinaggregation in Mitochondrien nach Hitzeschock von intakten HeLa Zellen	57
Abbildung 16: Proteinaggregation in isolierten Mitochondrien bei oxidativem Stress	58
Abbildung 17: Proteinaggregation in Mitochondrien bei oxidativem Stress intakter HeLa Zellen	59
Abbildung 18: Nukleotidabhängigkeit der Proteinaggregation nach Hitzestress	60
Abbildung 19: Zeitabhängige Aggregation mitochondrialer Proteine nach Hitzestress ...	61
Abbildung 20: Analyse der Aggregate nach Hitzestress mittels differenzieller Zentrifugation	63

Abbildung 21: Analyse der Aggregate nach Hitzestress mittels Sucrose-Dichtezentrifugation.....	65
Abbildung 22: Untersuchung der Assoziation von Tufm und dem Ribosom bei Hitzestress	66
Abbildung 23: Proteinase K-Resistenz von Tufm Aggregaten nach Hitzeschock	67
Abbildung 24: Regeneration aggregierter Proteine nach Hitzeschock	68
Abbildung 25: Degradation mitochondrialer Proteine bei Hitzestress	69
Abbildung 26: <i>In organello</i> Translation mitochondrial kodierter Proteine nach Hitzeschock	71
Abbildung 27: <i>In organello</i> Translation nach Hitzestress und Erholungsphase	72
Abbildung 28: <i>In vitro</i> Import nach Hitzestress	73
Abbildung 29: Vergleich der mitochondrialen Proteinaggregation nach Hitzeschock von frisch importierten Proteinen mit endogenen Proteinen.....	74
Abbildung 30: Modell des Schutzmechanismus der Mitochondrien bei proteotoxischem Stress	91

9 Literaturverzeichnis

- Akama K., Christian B. E., Jones C. N., Ueda T., Takeuchi N. & Spremulli L. L. (2010). Analysis of the functional consequences of lethal mutations in mitochondrial translational elongation factors. *Biochim. Biophys. Acta* **1802**: 692-698
- Altieri D. C., Stein G. S., Lian J. B. & Languino L. R. (2012). TRAP-1, the mitochondrial Hsp90. *Biochim. Biophys. Acta* **1823**: 767-773
- Anderson S., Bankier A. T., Barrell B. G., de Bruijn M. H., Coulson A. R., Drouin J., Eperon I. C., Nierlich D. P., Roe B. A., Sanger F., Schreier P. H., Smith A. J., Staden R. & Young I. G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**: 457-465
- Antonicka H., Sasarman F., Nishimura T., Paupe V. & Shoubbridge E. A. (2013). The mitochondrial RNA-binding protein GRSF1 localizes to RNA granules and is required for posttranscriptional mitochondrial gene expression. *Cell Metab.* **17**: 386-398
- Arai K., Kawakita M. & Kaziro Y. (1974). Studies on the polypeptide elongation factors from *E. coli*. V. Properties of various complexes containing EF-Tu and EF-Ts. *J. Biochem.* **76**: 293-306
- Ashrafi G. & Schwarz T. L. (2013). The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ.* **20**: 31-42
- Balaban R. S., Nemoto S. & Finkel T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* **120**: 483-495
- Balchin D., Hayer-Hartl M. & Hartl F. U. (2016). In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science* **353**: aac4354
- Becker T., Böttinger L. & Pfanner N. (2012). Mitochondrial protein import: from transport pathways to an integrated network. *Trends Biochem. Sci.* **37**: 85-91
- Bender T., Lewrenz I., Franken S., Baitzel C. & Voos W. (2011). Mitochondrial enzymes are protected from stress-induced aggregation by mitochondrial chaperones and the Pim1/LON protease. *Mol. Biol. Cell* **22**: 541-554
- Bezawork-Geleta A., Brodie E. J., Dougan D. A. & Truscott K. N. (2015). LON is the master protease that protects against protein aggregation in human mitochondria through direct degradation of misfolded proteins. *Sci. Rep.* **5**: 17397
- Bhadula S. K., Elthon T. E., Habben J. E., Helentjaris T. G., Jiao S. & Ristic Z. (2001). Heat-stress induced synthesis of chloroplast protein synthesis elongation factor (EF-Tu) in a heat-tolerant maize line. *Planta* **212**: 359-366
- Blumenthal T., Landers T. A. & Weber K. (1972). Bacteriophage Q replicase contains the protein biosynthesis elongation factors EF Tu and EF Ts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **69**: 1313-1317

- Bota D. A. & Davies K. J. (2002). Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism. *Nat. Cell Biol.* **4**: 674-680
- Bruderek M., Jaworek W., Wilkening A., Rüb C., Cenini G., Fortsch A., Sylvester M. & Voos W. (2018). IMiQ: a novel protein quality control compartment protecting mitochondrial functional integrity. *Mol. Biol. Cell* **29**: 256-269
- Buchan J. R. & Parker R. (2009). Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol. Cell* **36**: 932-941
- Bukau B., Weissman J. & Horwich A. (2006). Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* **125**: 443-451
- Cai Y. C., Bullard J. M., Thompson N. L. & Spremulli L. L. (2000). Interaction of mitochondrial elongation factor Tu with aminoacyl-tRNA and elongation factor Ts. *J. Biol. Chem.* **275**: 20308-20314
- Caldas T. D., El Yaagoubi A. & Richarme G. (1998). Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-Tu. *J. Biol. Chem.* **273**: 11478-11482
- Chacinska A., Koehler C. M., Milenkovic D., Lithgow T. & Pfanner N. (2009). Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* **138**: 628-644
- Chang R. L., Andrews K., Kim D., Li Z., Godzik A. & Palsson B. O. (2013). Structural systems biology evaluation of metabolic thermotolerance in Escherichia coli. *Science* **340**: 1220-1223
- Chaput M., Brygier J., Lion Y. & Sels A. (1983). Potentiation of oxygen toxicity by menadione in Saccharomyces cerevisiae. *Biochimie* **65**: 501-512
- Cherkasov V., Hofmann S., Druffel-Augustin S., Mogk A., Tyedmers J., Stoecklin G. & Bukau B. (2013). Coordination of translational control and protein homeostasis during severe heat stress. *Curr. Biol.* **23**: 2452-2462
- Chiti F. & Dobson C. M. (2017). Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu. Rev. Biochem.* **86**: 27-68
- Chomyn A. (1996). In vivo labeling and analysis of human mitochondrial translation products. *Methods Enzymol.* **264**: 197-211
- Chrétien D., Bénit P., Ha H. H., Keipert S., El-Khoury R., Chang Y. T., Jastroch M., Jacobs H. T. & Rustin P. (2018). Mitochondria are physiologically maintained at close to 50 °C. *PLoS Biol.* **16**: e2003992
- D'Silva P., Liu Q., Walter W. & Craig E. A. (2004). Regulated interactions of mtHsp70 with Tim44 at the translocon in the mitochondrial inner membrane. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**: 1084-1091

- David D. C., Ollikainen N., Trinidad J. C., Cary M. P., Burlingame A. L. & Kenyon C. (2010). Widespread protein aggregation as an inherent part of aging in *C. elegans*. *PLoS Biol.* **8**: e1000450
- Dennerlein S. & Rehling P. (2015). Human mitochondrial COX1 assembly into cytochrome c oxidase at a glance. *J. Cell Sci.* **128**: 833-837
- Deocaris C. C., Kaul S. C. & Wadhwa R. (2006). On the brotherhood of the mitochondrial chaperones mortalin and heat shock protein 60. *Cell Stress Chaperones* **11**: 116-128
- Detmer S. A. & Chan D. C. (2007). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**: 870-879
- Duncan R. & Hershey J. W. (1984). Heat shock-induced translational alterations in HeLa cells. Initiation factor modifications and the inhibition of translation. *J. Biol. Chem.* **259**: 11882-11889
- Evans S. S., Repasky E. A. & Fisher D. T. (2015). Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat. *Nat. Rev. Immunol.* **15**: 335-349
- Fiorese C. J., Schulz A. M., Lin Y. F., Rosin N., Pellegrino M. W. & Haynes C. M. (2016). The Transcription Factor ATF5 Mediates a Mammalian Mitochondrial UPR. *Curr. Biol.* **26**: 2037-2043
- Franzmann T. M. & Jahnel M. (2018). Phase separation of a yeast prion protein promotes cellular fitness. *Science* **359**: eaao5654
- Friedman J. R. & Nunnari J. (2014). Mitochondrial form and function. *Nature* **505**: 335-343
- Fu J., Momcilovic I. & Vara Prasad P. V. (2012). Roles of Protein Synthesis Elongation Factor EF-Tu in Heat Tolerance in Plants. *J. Botany* **2012**: 8
- Garcia D. M. & Jarosz D. F. (2014). Rebels with a cause: molecular features and physiological consequences of yeast prions. *FEMS Yeast Res.* **14**: 136-147
- Garcia-Mata R., Gao Y. S. & Sztul E. (2002). Hassles with taking out the garbage: aggravating aggresomes. *Traffic* **3**: 388-396
- Germaniuk A., Liberek K. & Marszalek J. (2002). A bichaperone (Hsp70-Hsp78) system restores mitochondrial DNA synthesis following thermal inactivation of Mip1p polymerase. *J. Biol. Chem.* **277**: 27801-27808
- Ghosh K. & Dill K. (2010). Cellular proteomes have broad distributions of protein stability. *Biophys. J.* **99**: 3996-4002
- Gross S. R. & Kinzy T. G. (2005). Translation elongation factor 1A is essential for regulation of the actin cytoskeleton and cell morphology. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**: 772-778

- Harbauer A. B., Zahedi R. P., Sickmann A., Pfanner N. & Meisinger C. (2014). The protein import machinery of mitochondria-a regulatory hub in metabolism, stress, and disease. *Cell Metab.* **19**: 357-372
- Hartl F. U. (2017). Protein Misfolding Diseases. *Annu. Rev. Biochem.* **86**: 21-26
- Hartl F. U., Bracher A. & Hayer-Hartl M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* **475**: 324-332
- Haynes C. M., Yang Y., Blais S. P., Neubert T. A. & Ron D. (2010). The matrix peptide exporter HAF-1 signals a mitochondrial UPR by activating the transcription factor ZC376.7 in *C. elegans*. *Mol. Cell* **37**: 529-540
- Hipp M. S., Park S. H. & Hartl F. U. (2014). Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases. *Trends Cell Biol.* **24**: 506-514
- Hotokezaka Y., Tobben U., Hotokezaka H., Van Leyen K., Beatrix B., Smith D. H., Nakamura T. & Wiedmann M. (2002). Interaction of the eukaryotic elongation factor 1A with newly synthesized polypeptides. *J. Biol. Chem.* **277**: 18545-18551
- Huang H. M., Zhang H., Xu H. & Gibson G. E. (2003). Inhibition of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex alters mitochondrial function and cellular calcium regulation. *Biochim. Biophys. Acta* **1637**: 119-126
- Iosefson O., Sharon S., Goloubinoff P. & Azem A. (2012). Reactivation of protein aggregates by mortalin and Tid1-the human mitochondrial Hsp70 chaperone system. *Cell Stress Chaperones* **17**: 57-66
- Johnston J. A., Ward C. L. & Kopito R. R. (1998). Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J. Cell Biol.* **143**: 1883-1898
- Kaganovich D., Kopito R. & Frydman J. (2008). Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. *Nature* **454**: 1088-1095
- Kang S. G., Dimitrova M. N., Ortega J., Ginsburg A. & Maurizi M. R. (2005). Human mitochondrial ClpP is a stable heptamer that assembles into a tetradecamer in the presence of ClpX. *J. Biol. Chem.* **280**: 35424-35432
- Kang Y., Fielden L. F. & Stojanovski D. (2017). Mitochondrial protein transport in health and disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* in press, doi: 10.1016/j.semcdb.2017.07.028
- Kanki T. & Klionsky D. J. (2010). The molecular mechanism of mitochondria autophagy in yeast. *Mol. Microbiol.* **75**: 795-800
- Kawaguchi Y., Kovacs J. J., McLaurin A., Vance J. M., Ito A. & Yao T. P. (2003). The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell* **115**: 727-738

- Kedersha N. L., Gupta M., Li W., Miller I. & Anderson P. (1999). RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* **147**: 1431-1442
- Kim I., Rodriguez-Enriquez S. & Lemasters J. J. (2007). Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch. Biochem. Biophys.* **462**: 245-253
- Kopito R. R. (2000). Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol.* **10**: 524-530
- Korbel D., Wurth S., Käser M. & Langer T. (2004). Membrane protein turnover by the m-AAA protease in mitochondria depends on the transmembrane domains of its subunits. *EMBO Rep.* **5**: 698-703
- Kudlicki W., Coffman A., Kramer G. & Hardesty B. (1997). Renaturation of rhodanese by translational elongation factor (EF) Tu. Protein refolding by EF-Tu flexing. *J. Biol. Chem.* **272**: 32206-32210
- Kulawiak B., Hopker J., Gebert M., Guiard B., Wiedemann N. & Gebert N. (2013). The mitochondrial protein import machinery has multiple connections to the respiratory chain. *Biochim. Biophys. Acta* **1827**: 612-626
- Labbadia J. & Morimoto R. I. (2015). The biology of proteostasis in aging and disease. *Annu. Rev. Biochem.* **84**: 435-464
- Lackner L. L. (2014). Shaping the dynamic mitochondrial network. *BMC Biol.* **12**: 35
- Leuenberger P., Ganscha S., Kahraman A., Cappelletti V., Boersema P. J., von Mering C., Claassen M. & Picotti P. (2017). Cell-wide analysis of protein thermal unfolding reveals determinants of thermostability. *Science* **355**: eaai7825
- Lin M. T. & Beal M. F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* **443**: 787-795
- Lindquist S. (1986). The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.* **55**: 1151-1191
- Ling M., Merante F., Chen H. S., Duff C., Duncan A. M. & Robinson B. H. (1997). The human mitochondrial elongation factor tu (EF-Tu) gene: cDNA sequence, genomic localization, genomic structure, and identification of a pseudogene. *Gene* **197**: 325-336
- Lucas-Lenard J. (1971). Protein biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **40**: 409-448
- Mayer M. P. (2013). Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism. *Trends Biochem. Sci.* **38**: 507-514
- Mayer M. P. & Bukau B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *CMLS* **62**: 670-684

- Medicherla B. & Goldberg A. L. (2008). Heat shock and oxygen radicals stimulate ubiquitin-dependent degradation mainly of newly synthesized proteins. *J Cell Biol* **182**: 663-673
- Mick D. U., Fox T. D. & Rehling P. (2011). Inventory control: cytochrome c oxidase assembly regulates mitochondrial translation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**: 14-20
- Miller S. B., Ho C. T., Winkler J., Khokhrina M., Neuner A., Mohamed M. Y., Guilbride D. L., Richter K., Lisby M., Schiebel E., Mogk A. & Bukau B. (2015). Compartment-specific aggregases direct distinct nuclear and cytoplasmic aggregate deposition. *EMBO J.* **34**: 778-797
- Minton A. P. (2000). Implications of macromolecular crowding for protein assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**: 34-39
- Moczko M., Schonfisch B., Voos W., Pfanner N. & Rassow J. (1995). The mitochondrial ClpB homolog Hsp78 cooperates with matrix Hsp70 in maintenance of mitochondrial function. *J. Mol. Biol.* **254**: 538-543
- Morimoto R. I. (1998). Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.* **12**: 3788-3796
- Murphy M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* **417**: 1-13
- Nargund A. M., Pellegrino M. W., Fiorese C. J., Baker B. M. & Haynes C. M. (2012). Mitochondrial import efficiency of ATFS-1 regulates mitochondrial UPR activation. *Science* **337**: 587-590
- Neupert W. (2015). A perspective on transport of proteins into mitochondria: a myriad of open questions. *J. Mol. Biol.* **427**: 1135-1158
- Neupert W. & Herrmann J. M. (2007). Translocation of proteins into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* **76**: 723-749
- Ngo J. K. & Davies K. J. (2007). Importance of the lon protease in mitochondrial maintenance and the significance of declining lon in aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1119**: 78-87
- Nillegoda N. B. & Bukau B. (2015). Metazoan Hsp70-based protein disaggregases: emergence and mechanisms. *Front. Mol. Biosci.* **2**: 57
- Nunnari J. & Suomalainen A. (2012). Mitochondria: in sickness and in health. *Cell* **148**: 1145-1159
- Olzmann J. A., Li L. & Chin L. S. (2008). Aggresome formation and neurodegenerative diseases: therapeutic implications. *Curr. Med. Chem.* **15**: 47-60

- Ostermann J., Horwich A. L., Neupert W. & Hartl F. U. (1989). Protein folding in mitochondria requires complex formation with hsp60 and ATP hydrolysis. *Nature* **341**: 125-130
- Ott M., Amunts A. & Brown A. (2016). Organization and Regulation of Mitochondrial Protein Synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **85**: 77-101
- Ott M., Gogvadze V., Orrenius S. & Zhivotovsky B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* **12**: 913-922
- Panas M. D., Ivanov P. & Anderson P. (2016). Mechanistic insights into mammalian stress granule dynamics. *J. Cell Biol.* **215**: 313-323
- Pellegrino M. W. & Haynes C. M. (2015). Mitophagy and the mitochondrial unfolded protein response in neurodegeneration and bacterial infection. *BMC Biol.* **13**: 22
- Quiros P. M., Mottis A. & Auwerx J. (2016). Mitonuclear communication in homeostasis and stress. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**: 213-226
- Qureshi M. A., Haynes C. M. & Pellegrino M. W. (2017). The mitochondrial unfolded protein response: Signaling from the powerhouse. *J. Biol. Chem.* **292**: 13500-13506
- Rampelt H., Kirstein-Miles J., Nillegoda N. B., Chi K., Scholz S. R., Morimoto R. I. & Bukau B. (2012). Metazoan Hsp70 machines use Hsp110 to power protein disaggregation. *EMBO J.* **31**: 4221-4235
- Rao D., Momcilovic I., Kobayashi S., Callegari E. & Ristic Z. (2004). Chaperone activity of recombinant maize chloroplast protein synthesis elongation factor, EF-Tu. *Eur. J. Biochem.* **271**: 3684-3692
- Rep M., van Dijl J. M., Suda K., Schatz G., Grivell L. A. & Suzuki C. K. (1996). Promotion of mitochondrial membrane complex assembly by a proteolytically inactive yeast Lon. *Science* **274**: 103-106
- Richarme G. (1998). Protein-disulfide isomerase activity of elongation factor EF-Tu. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **252**: 156-161
- Richter K., Haslbeck M. & Buchner J. (2010). The heat shock response: life on the verge of death. *Mol. Cell* **40**: 253-266
- Richter-Dennerlein R., Dennerlein S. & Rehling P. (2015). Integrating mitochondrial translation into the cellular context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**: 586-592
- Ristic Z., Bukovnik U., Momcilovic I., Fu J. & Vara Prasad P. V. (2008). Heat-induced accumulation of chloroplast protein synthesis elongation factor, EF-Tu, in winter wheat. *J. Plant Physiol.* **165**: 192-202
- Ron D. & Walter P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**: 519-529

- Röttgers K., Zufall N., Guiard B. & Voos W. (2002). The ClpB homolog Hsp78 is required for the efficient degradation of proteins in the mitochondrial matrix. *J. Biol. Chem.* **277**: 45829-45837
- Satav J. G., Katyare S. S., Fatterparker P. & Sreenivasan A. (1977). Study of protein synthesis in rat liver mitochondria use of cycloheximide. *Eur. J. Biochem.* **73**: 287-296
- Schmidt O., Pfanner N. & Meisinger C. (2010). Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**: 655-667
- Schmitt M., Neupert W. & Langer T. (1996). The molecular chaperone Hsp78 confers compartment-specific thermotolerance to mitochondria. *J. Cell Biol.* **134**: 1375-1386
- Schulz A. M. & Haynes C. M. (2015). UPR(mt)-mediated cytoprotection and organismal aging. *Biochim. Biophys. Acta* **1847**: 1448-1456
- Schwarz N. & Leube R. E. (2016). Intermediate Filaments as Organizers of Cellular Space: How They Affect Mitochondrial Structure and Function. *Cells* **5**: doi: 10.3390/cells5030030
- Schweers R. L., Zhang J., Randall M. S., Loyd M. R., Li W., Dorsey F. C., Kundu M., Opferman J. T., Cleveland J. L., Miller J. L. & Ney P. A. (2007). NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 19500-19505
- Selkoe D. J. (2003). Folding proteins in fatal ways. *Nature* **426**: 900-904
- Shi Y., Mosser D. D. & Morimoto R. I. (1998). Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev.* **12**: 654-666
- Slater A., Cato A. C., Sillar G. M., Kioussis J. & Burdon R. H. (1981). The pattern of protein synthesis induced by heat shock of HeLa cells. *Eur. J. Biochem.* **117**: 341-346
- Smeitink J. A., Elpeleg O., Antonicka H., Diepstra H., Saada A., Smits P., Sasarman F., Vriend G., Jacob-Hirsch J., Shaag A., Rechavi G., Welling B., Horst J., Rodenburg R. J., van den Heuvel B. & Shoubbridge E. A. (2006). Distinct clinical phenotypes associated with a mutation in the mitochondrial translation elongation factor EFTs. *Am. J. Hum. Genet.* **79**: 869-877
- Suzuki H., Ueda T., Taguchi H. & Takeuchi N. (2007). Chaperone properties of mammalian mitochondrial translation elongation factor Tu. *J Biol Chem* **282**: 4076-4084
- Tatsuta T. (2009). Protein quality control in mitochondria. *J. Biochem.* **146**: 455-461
- Tatsuta T. & Langer T. (2008). Quality control of mitochondria: protection against neurodegeneration and ageing. *EMBO J.* **27**: 306-314
- Taylor S. W., Fahy E. & Ghosh S. S. (2003). Global organellar proteomics. *Trends Biotechnol.* **21**: 82-88

Topf U., Wrobel L. & Chacinska A. (2016). Chatty Mitochondria: Keeping Balance in Cellular Protein Homeostasis. *Trends Cell. Biol.* **26**: 577-586

Tyedmers J., Mogk A. & Bukau B. (2010). Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**: 777-788

Valente L., Tiranti V., Marsano R. M., Malfatti E., Fernandez-Vizarra E., Donnini C., Mereghetti P., De Gioia L., Burlina A., Castellan C., Comi G. P., Savasta S., Ferrero I. & Zeviani M. (2007). Infantile encephalopathy and defective mitochondrial DNA translation in patients with mutations of mitochondrial elongation factors EFG1 and EFTu. *Am. J. Hum. Genet.* **80**: 44-58

Varabyova A., Stojanovski D. & Chacinska A. (2013). Mitochondrial protein homeostasis. *IUBMB Life* **65**: 191-201

Vetri V. & Fodera V. (2015). The route to protein aggregate superstructures: Particulates and amyloid-like spherulites. *FEBS Lett* **589**: 2448-2463

Voos W. (2009). Mitochondrial protein homeostasis: the cooperative roles of chaperones and proteases. *Res. Microbiol.* **160**: 718-725

Voos W. (2013). Chaperone-protease networks in mitochondrial protein homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**: 388-399

Voos W. & Röttgers K. (2002). Molecular chaperones as essential mediators of mitochondrial biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1592**: 51-62

Wang K. & Klionsky D. J. (2011). Mitochondria removal by autophagy. *Autophagy* **7**: 297-300

Welch W. J. (1992). Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol. Rev.* **72**: 1063-1081

Welch W. J. & Suhan J. P. (1985). Morphological study of the mammalian stress response: characterization of changes in cytoplasmic organelles, cytoskeleton, and nucleoli, and appearance of intranuclear actin filaments in rat fibroblasts after heat-shock treatment. *J. Cell Biol.* **101**: 1198-1211

Wloch-Salamon D. M. & Bem A. E. (2013). Types of cell death and methods of their detection in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.* **114**: 287-298

Wolozin B. (2012). Regulated protein aggregation: stress granules and neurodegeneration. *Mol. Neurodegener.* **7**: 56

Wrobel L., Topf U., Bragoszewski P., Wiese S., Sztolsztener M. E., Oeljeklaus S., Varabyova A., Lirski M., Chroscicki P., Mroczek S., Januszewicz E., Dziembowski A., Kobłowska M., Warscheid B. & Chacinska A. (2015). Mistargeted mitochondrial proteins activate a proteostatic response in the cytosol. *Nature* **524**: 485-488

Youle R. J. & Narendra D. P. (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**: 9-14

Youle R. J. & van der Bliek A. M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* **337**: 1062-1065

Zhao Q., Wang J., Levichkin I. V., Stasinopoulos S., Ryan M. T. & Hoogenraad N. J. (2002). A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *EMBO J.* **21**: 4411-4419

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Wolfgang Voos bedanken, der mir die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Arbeit gegeben hat und mir während dieser Zeit stets unterstützend und beratend zur Seite gestanden hat.

Des Weiteren danke ich Prof. Walter Witke für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie allen anderen Mitgliedern der Prüfungskommission.

Mein besonderer Dank gilt meinen Arbeitskollegen Dr. Giovanna Cenini, Witold Jaworek, Karen Pollecker, Margaritha Fuhrmann, Dr. Cornelia Rüb und Dr. Michael Bruderek für die gemeinsame Zeit im Labor. Ich danke euch für die vielen hilfreichen Diskussionen, die Unterstützung und das freundliche Miteinander in unserer Arbeitsgruppe.

Außerdem danke ich Bernd Gehrig und Dr. Marc Sylvester für die Durchführung und Auswertung der Massenspektrometrie-Analysen.

Von ganzem Herzen möchte ich auch meiner Familie und meinen Freunden danken, die mich auf meinem bisherigen Lebensweg immer unterstützt haben.